

## 基础研究

# 转染胶质细胞源性神经营养因子基因的骨髓间充质干细胞对大鼠脊髓损伤后神经轴突再生的影响

叶劲涛,程斌,樊李瀛,吴玮,张格林,沈维燕,薛建利

(西安交通大学第二附属医院骨科 710004 西安市)

**【摘要】目的:**探讨转染胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)基因的大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对大鼠脊髓损伤后神经轴突再生的影响。**方法:**取 SD 雌性大鼠的双侧股骨,冲洗髓腔分离培养得到的 BMSCs,通过荧光素标记技术检测细胞表面标志物 CD29、CD90、CD34、CD45,以确认是否得到 BMSCs。构建 GDNF 过表达慢病毒用以感染 BMSCs,加入感染分数分别为 10、50、80、100、150、200 的重组慢病毒悬液。在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况以表达细胞数量,评价转染效果,Western blot 检测转染后 GDNF 在 BMSCs 中的表达,以四唑蓝比色法(MTT)法检测转染 GDNF 基因的 BMSCs 的细胞活力。将 50 只 SD 大鼠通过 Allen's 打击法制备脊髓打击伤模型,造模成功后随机分为三组:A 组(20 只)为单纯 BMSCs 组,使用微量注射器移植未转染的 BMSCs;B 组(20 只)为 BMSCs 转染组,使用微量注射器移植转染 GDNF 基因的 BMSCs;C 组(10 只)为模型对照组,造模后脊髓内注射 DMEM 培养基。于造模后 7d、14d、28d 对大鼠进行 BBB 运动功能评分。各组均于造模后 7d、14d、28d 各取 5 只麻醉处死灌注取材后行 HE 染色并镜下观察。A、B 两组采用免疫组织化学染色观察 GFAP、NSE、NF-200 在脊髓内的表达,以评估神经轴突生长情况。**结果:**经分离培养得到的细胞呈长纺锤状,以类似成纤维细胞样集落生长。流式细胞术测定结果显示所培养的细胞阳性高度表达 CD29、CD90,未表达 CD34、CD45,表明分离培养所得细胞为 BMSCs。当 MOI=100 时,转染 12h 后,BMSCs 显著表达 GFP,提示转染成功。Western blot 结果显示 GFP 表达情况良好。MTT 法显示转染 7d 后 BMSCs 组细胞活力明显高于未转染 BMSCs 组。术后 7d 时,三组 BBB 评分无显著差异。术后 14d,B 组的 BBB 评分  $5.80 \pm 0.19$  分与 A 组  $3.60 \pm 0.18$  分及 C 组  $3.10 \pm 0.14$  分相比均有显著性差异( $P < 0.05$ )。术后 28d,B 组的 BBB 评分  $11.90 \pm 0.28$  分与 A 组  $8.30 \pm 0.29$  分及 C 组  $5.70 \pm 0.18$  分相比有显著性差异( $P < 0.05$ )。GFAP、NSE、免疫组化染色光密度统计结果均显示 A 组和 B 组有显著性差异,B 组明显优于 A 组,具有统计学意义( $P < 0.05$ )。NF-200 神经纤维长度统计结果提示 B 组为  $89.98 \pm 28.31 \mu\text{m}$ ,A 组为  $23.64 \pm 13.45 \mu\text{m}$ ,两组之间存在显著差异( $P < 0.05$ )。**结论:**GDNF 转染 BMSCs 具有较高的细胞活性,能够提升 BMSCs 促进神经轴突再生的能力。

**【关键词】**脊髓损伤;骨髓间充质干细胞;胶质细胞源性神经营养因子

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.06.12

中图分类号:R-332,Q593+.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2019)-06-0556-09

**Effect of GDNF gene transfection of BMSC on axon regeneration after spinal cord injury/YE Jintao, CHENG Bin, FAN Liying, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(6): 556-564**

**【Abstract】Objectives:** To explore the effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells(BMSCs) transfected with glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) on axonal regeneration after spinal cord injury in rats. **Methods:** Bilateral femurs of SD female rats were collected, and the medullary cavity was rinsed to isolate and culture BMSCs. The cell surface markers CD29, CD90, CD34 and CD45 were detected by using fluoresce in labeling technology to confirm the isolation of mesenchymal stem cells. To construct GDNF overexpressed lentiviruses to infect BMSCs, the recombinant lentiviral suspensions with infection fractions of 10, 50, 80, 100, 150 and 200 were added. Green fluorescent protein(GFP) expression was observed under fluorescent microscope to evaluate transfection cells expressing effect, GDNF expression in BMSCs after transfection was

基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目(编号 2016SF-187);西安市科技计划项目[编号 2017115SF/YX009(13)]

第一作者简介:男(1993-),博士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(029)87679621 E-mail:yejintao@163.com

通讯作者:薛建利 E-mail:1102730209@qq.com

detected by Western blot. BMSCs transfected with GDNF gene were detected by MTT assay. Fifty SD rats were used to establish spinal cord blow injury model by using Allen's blow method. After successful modeling, they were randomly divided into three groups: group A was pure BMSCs group, and BMSCs without transfection were transplanted with microsyringe; group B was the BMSCs transfection group, and BMSCs transfected with GDNF gene were transplanted with microsyringe; group C was the model control group, and DMEM medium was injected into spinal cord after modeling. BBB motor function score was performed on 7, 14 and 28 days after modeling. HE staining and microscopic observation were performed after anesthesia and perfusion. The expressions of GFAP, NSE and NF-200 in spinal cord were observed by immunohistochemical staining to evaluate the growth of axons. **Results:** BMSCs were isolated and cultured in a long spindle shape and grew in a fibroblast-like colony. The results of flow cytometry showed that CD29 and CD90 were highly expressed in BMSCs, while CD34 and CD45 were not expressed, indicating that the cells obtained in this study were mesenchymal stem cells. When MOI=100, BMSCs significantly expressed GFP at 12 hours after transfection, indicating successful transfection. Western blot results showed that GDFP was well expressed. MTT assay showed that the cell viability of BMSCs group was significantly higher than that of untransfected BMSCs group at 7 days after transfection. At 7 days after surgery, there was no significant difference in BBB score among the three groups. At 14 days after surgery, the BBB score of  $5.80 \pm 0.19$  in group B was significantly different from  $3.60 \pm 0.18$  in group A and  $3.10 \pm 0.14$  in group C. At 28 days after surgery, the BBB score of  $11.90 \pm 0.28$  in group B was significantly different from  $8.30 \pm 0.29$  in group A and  $5.78 \pm 0.18$  in group C ( $P < 0.05$ ). The optical density statistics of GFAP, NSE and immunohistochemical staining showed significant differences between group A and group B, and group B was significantly better than group A, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). The statistical results of NF-200 nerve fiber length suggested  $89.98 \pm 28.31 \mu\text{m}$  in group B and  $23.64 \pm 13.45 \mu\text{m}$  in group A, with significant differences between these two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** GDNF can successfully transfect BMSCs. The BMSCs have high cell viability after transfection. Transfection of GDNF gene can enhance the ability of BMSCs to promote axonal regeneration.

**[Key words]** Spinal cord injury; Bone marrow mesenchymal stem cells; Glial cell-derived neurotrophic factor

**[Author's address]** Department of Orthopaedics, Xi'an Jiaotong University Second Affiliated Hospital, Xi'an, 710004, China

脊髓损伤是脊柱创伤中最为严重的损伤,是导致截瘫的最常见原因<sup>[1]</sup>。脊髓损伤后由于轴突变性坏死、神经元死亡等病理变化,最终导致患者丧失责任节段运动能力、生活质量极大下降。并且由于长期卧床,往往伴随肺部感染、褥疮等多种并发症,不仅给患者本人造成巨大痛苦,也让患者家庭和社会背负了沉重的经济负担<sup>[2]</sup>。脊髓损伤后的神经修复和再生仍然是困扰着医学界的一大难题,寻求有效的治疗方法和手段具有重要的医学、社会和经济价值。

外源性干细胞移植是近十几年来脊髓损伤治疗的研究热点。其中,骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)为神经的再生和修复提供了一个极具吸引力的细胞来源。而胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是目前发现的活性最强的运动神经元营养因子<sup>[3]</sup>,被广泛地应用于帕金森等神经系统相关的疾病的治

疗<sup>[4]</sup>。本研究拟通过慢病毒将 GDNF 转染进入 BMSCs,观察转染 GDNF 基因的 BMSCs 对脊髓损伤后神经轴突再生的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及仪器

FITC 标记小鼠抗大鼠 CD90、PE 标记小鼠抗大鼠 CD29、CD34、CD45 (BD 公司,美国);GDNF 过表达慢病毒(吉凯基因,上海);修改为兔抗鼠 GDNF、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、神经丝蛋白 200 (neurofilament-200, NF-200)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)一抗(abcam 公司,美国);DAB 试剂盒,山羊封闭血清,一抗稀释液(武汉博士德生物工程有限公司);脊髓打击器械。

### 1.2 细胞实验

**1.2.1 大鼠 BMSCs 的分离培养及体外扩增** 项目符合 NIH 及西安交通大学动物实验管理委员

会相关规定。实验中包括合理的实验终点、麻醉方案,减少相应动物痛苦的措施,动物安乐死方式,实验结束动物尸体处理等。西安交通大学动物实验伦理审查批准编号 No.XJTMLAC2018-454。取体重约 150g 的 SD 雌性大鼠,麻醉后处死,用组织剪将双侧股骨快速取材,在 75%乙醇中浸泡 3min 后取出。无菌条件下以磷酸盐缓冲液 (NaCl/Pi buffer) 冲洗股骨 3 次,剪去股骨远近端的骨骺,低糖改良杜氏伊格尔培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 反复冲洗髓腔 3 次,冲洗液收集于培养皿中。将冲洗液以巴氏吸管冲洗吹打,接种于培养瓶中,加入低糖 DMEM 及 15%胎牛血清培养基。2d 后换液,以后每 2d 更换培养液。待细胞生长铺满至瓶底约 85%以上融合时,用含有乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 的胰蛋白酶进行消化,在显微镜下观察消化约 40s 后,可以见到细胞回缩,间隙增大,此时采用胎牛血清终止消化,顺序吹打摇晃细胞培养瓶底,收集细胞悬液以 1000r/min 离心 10min,弃去上清,底层细胞分别用培养基重新混匀,按照 1:2 的比例接种培养,为第 1 代。

**1.2.2 细胞表面标记的鉴定** 收集第 2 代生长良好的细胞,将洗培养瓶以 PBS 清洗 3 次,胰酶消化 1min 后,将细胞悬液吹打均匀,然后吸取 1ml 细胞悬液置于离心管中,1000r/min 离心 10min,弃去上清,再次离心后弃上清,用 PBS 溶液重新制备浓度为  $1 \times 10^6$ /ml 的细胞悬液,向 100 $\mu$ l 悬液中分别加入 FITC 标记小鼠抗大鼠 CD90、CD29、CD34、CD45 单抗 20 $\mu$ l,设置阴性对照,室温避光孵育 30min 后,分别加入 PBS 1.5ml,混匀,转速 1000r/min 离心 10min 后,弃去上清,以 500 $\mu$ l PBS 重悬,上机检测,分析计算所培养的细胞对 CD90、CD29、CD34、CD45 分子的表达情况<sup>[5,6]</sup>。

**1.2.3 GDNF 过表达慢病毒转染 BMSCs** 将生长良好的第 2 代 BMSCs 接种于 6 孔板,调整细胞数目达到  $1 \times 10^5$  个/孔,在细胞培养箱中培养 24h 后,换液,实验组以 GDNF 过表达慢病毒转染 BMSCs,每孔加入感染分数 (multiplicity of infection, MOI) 分别为 10、50、80、100、150、200,且总体积为 2ml 的重组慢病毒悬液和单纯 DMEM 培养液,之后将 6 孔板置于细胞培养箱中孵育 2h,之后更换为 10%的 FBS+DMEM 培养液,然后每隔 12h 观察 GFP 的表达情况,观察 72h 后,于荧

光显微镜下观察细胞状态和荧光情况,确定细胞状态较好且荧光数较多的孔对应为最佳的 MOI,在此 MOI 值基础上进行后续实验和检测。

**1.2.4 BMSCs 细胞活力检测** 将 BMSCs、转染 GDNF 基因的 BMSCs 接种于 96 孔板中,调整每孔密度为  $1 \times 10^4$  个细胞,孵育 24h,弃去培养液,以 PBS 清洗 3 次,设定 A 组为 BMSCs 组, B 组为 BMSCs 转染组,两组随机分配 5 块 96 孔板, A 组加入 200 $\mu$ l 含 15%胎牛血清的 DMEM,每 2d 更换培养基; B 组加入 200 $\mu$ l 含 10%胎牛血清的低糖 DMEM,当培养 1、3、5、7、9d 后分别从各组随机取出一块 96 孔板,每孔中加入 20 $\mu$ l MTT 工作液后,置于培养箱中孵育。4h 后避光弃去每个孔板中液体,然后每孔中加入 150 $\mu$ l DMSO,摇床上摇 15min,在 492nm 波长条件下用酶标仪检测孔板吸光度,重复 3 次。

**1.2.5 检测 GDNF 蛋白在 BMSCs 中的表达** 将生长良好的第 2 代 BMSCs 接种于 6 孔板,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$ /孔,以最佳 MOI 值转染,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育。在转染 7d 后,提取细胞总 RNA,反转录制备 cDNA,然后以 cDNA 为模板,在反应体系中加入目的基因的引物,设定 94 $^{\circ}$ C, 4min 预变形; 94 $^{\circ}$ C, 30s 变性, 55 $^{\circ}$ C, 1min 退火; 72 $^{\circ}$ C, 15min 延伸; 总循环数 35,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。其中, rGDNF 基因的引物序列, 正义链: 5'-ATGAAGTTATGGGATGTCGTGGC-3'; 反义链: 5'-CGTTTAGCGGAATGCTTCTTAGGA-3'。

### 1.3 动物实验

**1.3.1 脊髓打击伤模型的建立和细胞移植** 清洁级成年健康 Sprague-Dawley 大鼠, 体重  $213.4 \pm 15.1$ g, 购于西安交通大学医学院实验动物中心。50 只 SD 健康成年雌性大鼠随机分为: A 组 20 只, 伤后脊髓内注射未转染大鼠 BMSCs; B 组 20 只, 伤后脊髓内注射转染 GDNF 的大鼠 BMSCs; C 组对照组 10 只, 伤后脊髓内注射 DMEM。按照急性脊髓损伤大鼠 Allen's 造模方法, 制成一撞击装置, 由撞杆、外周套管击锤及外固定架等组成。撞击体的头部为 2.3mm, 撞击锤重量为 9g, 下落高度 1.5cm, 下落致伤的冲击力为  $9g \times 1.5cm$ 。室温 25 $^{\circ}$ C 条件下, 用 1%戊巴比妥钠以 40mg/kg 剂量行腹腔注射麻醉, 固定于大鼠固定架上。沿正中线切开脊髓胸背部皮肤及皮下组织长约 4cm, 定位 T11 椎体棘突, 钝性分离 T9~T11 椎体两旁肌肉,

撑开器撑开固定,暴露上述三个椎体,行椎板切开术。将撞杆头端置于 T10 段脊髓,固定打击外套管,将击锤自 1.5cm 高度沿外套管自由落下冲击撞杆,造成 T10 段脊髓挫伤(图 1)。术中可见身体向前扑动、甩尾、呼吸暂停表示造模成功。于距伤区头尾端 2mm,中线旁 0.75mm 共四点进针,深度 1.2mm,以 1 $\mu$ l/min 的速率注射 2.5 $\mu$ l 浓度为 4 $\times 10^4$ / $\mu$ l 的细胞悬液,留针 2min,四点共 10 $\mu$ l。明胶海绵止血,逐层缝合肌肉、皮下组织和皮肤,术后自由进食水,每日按摩膀胱挤尿 3 次,持续 5d。对照组大鼠用同样方法注射共 10 $\mu$ l DMEM。实验过程中因术后感染或者麻醉意外死亡的动物数目:A 组 3 只、B 组 3 只、C 组 2 只,分别在相同条件下予以补充。

**1.3.2 大鼠的神经功能评分** 在预定的观察时间,即造模后 7、14、28d,每组 10 只大鼠在平面开阔地采用 BBB 评分法进行运动功能评分,由非本组实验人员但熟悉评分标准者完成,重复 3 次,取平均值。

**1.3.3 大鼠脊髓标本取材** 在正常室温 26 $^{\circ}$ C 下,在预定的观察时间,即细胞移植后 7、14、28d(每组 5 只),各组大鼠用 1%戊巴比妥钠 40mg/kg 行腹腔注射麻醉,麻醉成功后,固定大鼠,打开胸腔,将心脏暴露出来,用眼科剪剪开右心耳,从左心室插管至主动脉弓,通过插管将 4 $^{\circ}$ C 生理盐水冲洗至右心耳流出清亮液体,肢体及内脏器官发白,然后再将 4%多聚甲醛经心脏灌注固定,灌注约 250ml,然后以打击伤处为中心,将脊髓组织取出,再放于 4%多聚甲醛中后固定 24h,常规石蜡包埋,通过 HE 染色、免疫组化观察脊髓恢复情况。

**1.3.4 HE 染色** 取材后经脱水和包埋,脱蜡后用苏木素及伊红染色。于镜下观察。

**1.3.5 免疫组织化学染色** 将组织切片在 PBS 中漂洗 5min $\times 3$  次;之后在 3% $H_2O_2$  (80%甲醇)中室温静置 10min,再次 PBS 漂洗;滴加山羊血清封闭液,37 $^{\circ}$ C,1h;吸去多余封闭液,分别滴加一抗,兔抗 GFAP 抗体(1:50)、兔抗 NSE 抗体(1:200)、兔抗 NF-200 抗体(1:100)4 $^{\circ}$ C 过夜;37 $^{\circ}$ C 复温 1h, PBS 中漂洗;滴加山羊抗兔-生物素抗体工作液,37 $^{\circ}$ C 1h, PBS 漂洗;滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液 37 $^{\circ}$ C 30min, PBS 漂洗;滴加 DAB 显色剂;显微镜下控制染色程度,自来水冲洗;脱水、透明;中性树胶封片,镜检;阴性对照一抗采用 PBS 代

替。对于 GFAP、NSE 结果采用光密度法评估,用 Image-pro plus 5.1 软件进行分析每组各选 3 张切片,计算每个视野阳性细胞光密度,然后取其平均值。NF-200 结果选择相应部位,计算阳性纤维长度,然后取其平均值。

#### 1.4 统计学分析

所有收集的样本,如细胞活力值、BBB 评分、GFAP、NSE 免疫组化光密度统计结果和 NF-200 神经纤维长度统计结果采用非配对 *t* 检验。细胞活力值、BBB 评分、GFAP、NSE 免疫组化光密度统计结果和 NF-200 神经纤维长度统计结果采用均值 $\pm$ 标准差表示,SPSS 16 统计软件对各组数据进行分析,计量资料采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的形态学观察

培养 4d 后可见新生细胞,呈散在分布,大多数为长梭形或纤维样细胞,胞浆丰富,核染色质细,核仁明显,呈平行排列或漩涡样生长(图 2a)。原代培养中大概 30% 的细胞在接种 48~72h 后开始贴壁。经过 7d 的培养,所有的细胞都呈长纺锤状。当细胞在第 10d 达到 90% 左右的融合时,进行传代。经过了 5d 时间的倍增,BMSCs 以形态均匀的类似成纤维细胞样集落生长。

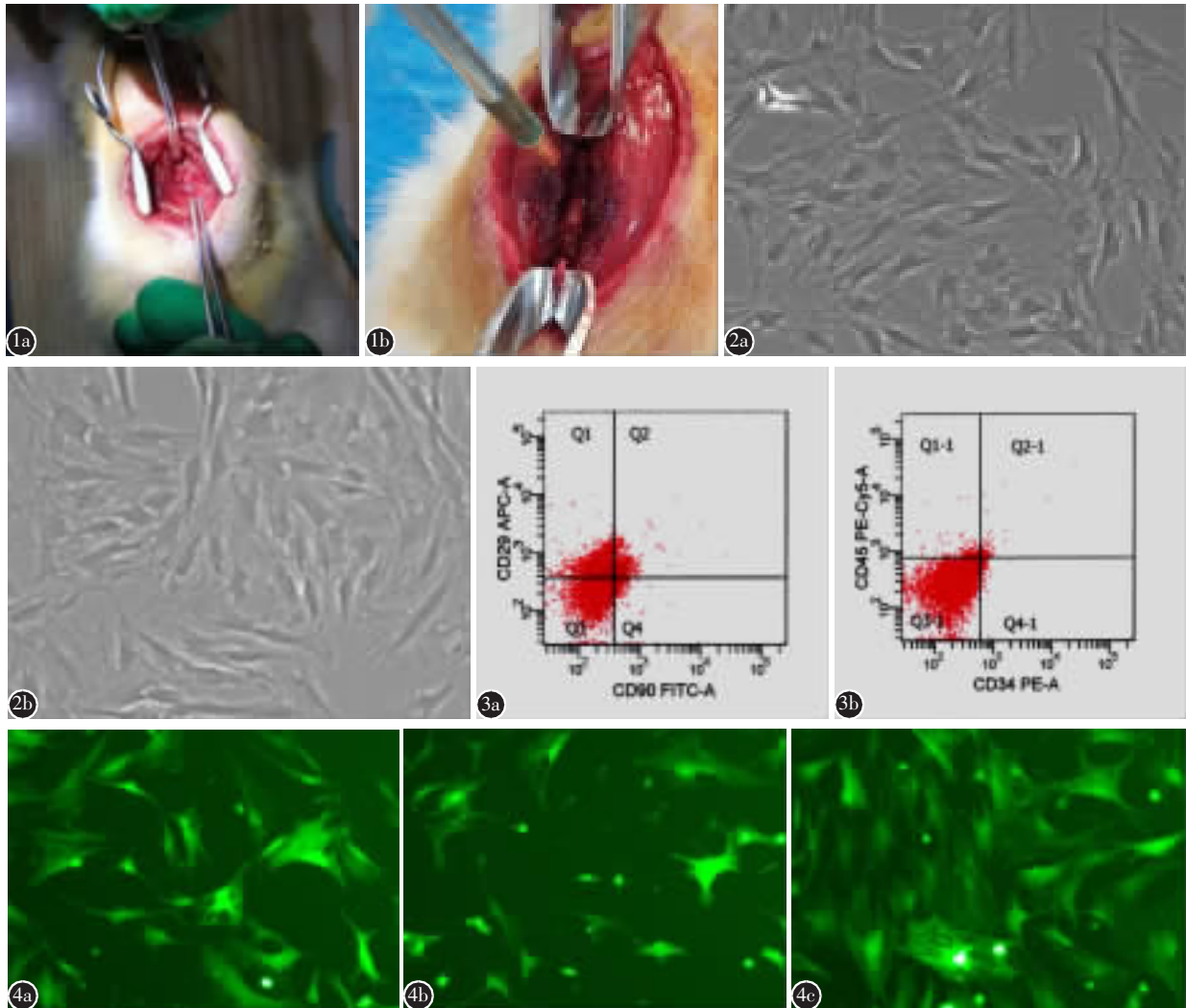
传代培养:经胰酶消化后的 BMSCs 呈圆形,传代后 24h 内贴壁、伸展仍呈长梭形或多角形,传代后的 BMSCs 生长迅速,生长 4d 左右细胞即呈 90% 左右融合,此时细胞呈长梭形,放射状或栅栏状分布。体外培养 10~13 代以上,细胞增殖速度减缓,出现细胞老化现象(图 2b)。

### 2.2 细胞表面分子检测结果

流式细胞术测定表明,BMSCs 阳性高度表达 CD29、CD90(图 3a),阴性表达 CD45、CD34(图 3b),表明本研究分离培养所得的为 BMSCs。

### 2.3 GDNF 基因转染 BMSCs

MOI=100 时,转染 12h 后,BMSCs 显著表达 GFP。且细胞形态完整,没有明显的细胞病变效应;当 MOI<100 时,在 BMSCs 中高表达 GFP 的细胞数量显著减少;当 MOI>100 时,细胞中的荧光强度较 MOI=100 时高,但 BMSCs 都出现不同程度的细胞病变效应(图 4)。当 MOI=0 时,细胞中无绿色荧光表达。所以在本研究中,MOI=100 是



**图 1** 脊髓撞击模型的建立 **a** 大鼠麻醉完成后,固定于操作台上,钝性分离椎体两旁肌肉,撑开器撑开固定,行椎板切开术 **b** 脊髓完全暴露后,使用撞杆制造撞击模型 **图 2** BMSCs 的形态学( $\times 100$ ) **a** 原代培养 7d 时,可见大鼠骨髓间充质干细胞大部分呈长梭形,胞浆丰富 **b** 传代培养 4d 时,细胞分布呈放射状分布,初代后 4d 时的生长密度即大约等同原代培养 7d 时 **图 3** 流式细胞仪检测 BMSCs 细胞表面标志物 **a** CD29、CD90,超过 1/2 的荧光点处于 Q1、Q2、Q3,说明其中 BMSCs 的数量超过 1/2 **b** CD34、CD45,大部分荧光点处于 Q3-1,说明采集到的造血干细胞很少 **图 4** 不同感染复数下对 BMSCs 转染效率的检测情况 ( $\times 100$ ) **a** MOI=100 时,BMSCs 显著表达 GFP,且细胞形态完整 **b** 当 MOI<100 时,在 BMSCs 中高表达 GFP 的细胞数量显著减少 **c** 当 MOI>100 时,细胞中的荧光强度较 MOI=100 时高,但 BMSCs 都出现不同程度的细胞病变效应

**Figure 1** A rat model of spinal cord injury **a** After anaesthesia, rats were fixed on the operating panel. The muscles on both sides of the vertebral body were separated bluntly, and laminotomy was performed **Figure 2** BMSCs morphology( $\times 100$ ) **a** After 7 days of primary culture, mesenchymal stem cells in rat bone marrow appeared mostly long spindle, with abundant cytoplasm **b** The growth density at 4 days after the initial generation was approximately the same as that at 7 days after the primary culture and the cells distributed radially **Figure 3** Detecting cell surface markers of BMSCs by flow cytometry **a** CD29, CD90. It can be seen that more than 1/2 of the fluorescence points are in Q1, Q2 and Q3, indicating that the number of BMSCs was more than 1/2 **b** CD34, CD45. It can be seen that most fluorescence points are at q3-1, indicating that few hematopoietic stem cells had been collected **Figure 4** Transfection efficiency for BMSCs on different multiplicity of infection(MOI)( $\times 100$ ) **a** When MOI=100, BMSCs significantly expressed GFP and the cell morphology was intact **b** When MOI<100, the number of cells that highly express GFP in BMSCs was significantly reduced **c** When MOI>100, the fluorescence intensity in the cells was higher than that at MOI=100, but BMSCs showed different degrees of cytopathic effects

最佳感染分数。

**2.4 转染后的 BMSCs 的细胞活力**

MTT 法显示转染后 BMSCs 在 3~5d 时生长迅速,6~7d 生长速度较前减缓。转染 1d 后,A、B 两组细胞活力差异无统计学意义( $P>0.05$ ),转染 3d 后,B 组细胞活力逐渐高于 A 组,A 组与 B 组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )(表 1)。

**2.5 转染后 GDNF 蛋白在 BMSCs 中的表达**

GDNF 基因转染 BMSCs 7d 后,Western blot 结果显示 BMSCs 表达 GDNF 蛋白(图 5)。

**2.6 大鼠后肢神经功能评分结果**

大鼠于术后 7、14、28d 行 BBB 功能评分。术后 7d 时,A、B、C 三组 BBB 评分没有显著差异( $P>0.05$ ); 术后 14d 时,A 和 C 组的 BBB 评分没有显著差异 ( $P>0.05$ ),B 组和 A、C 组相比有显著

性差异( $P<0.05$ )。术后 28d 时,A、B、C 组之间均存在明显差异( $P<0.05$ )。表明 BMSCs 有修复神经损伤的能力,而 GDNF 能够提升 BMSCs 的修复脊髓神经损伤的能力(表 2)。

**2.7 组织学观察**

术后 7d,各组可见大鼠脊髓前角组织中大量炎性细胞和空腔,白质中出现一些微囊以及神经纤维坏死。术后 14d,各组脊髓损伤组织可见纤维结缔组织填充,组织致密,星形胶质细胞增生并聚集于胶质瘢痕周围,B 组中增生的神经细胞数目明显多于 A 组。术后 28d, 各组仍可看到瘢痕组织,但坏死囊腔减少,组织更加致密,神经细胞数目较 28d 时增多,B 组的神经细胞增生数目明显增多,A 组可见一些神经细胞增生(图 6)。

**2.8 GFAP、NSE、NF-200 在脊髓中的表达**

术后 28d,GFAP、NSE 免疫组化染色结果显示脊髓损伤区 B 组 GFAP、NSE 大量表达,蓝色为细胞核,周围可见大量褐染胞质(图 7a~d),表达强度明显比 A 组高,具有统计学意义( $P<0.05$ )。NF-200 免疫组化染色结果显示脊髓损伤区 B 组 NF-200 阳性神经纤维长度长于 A 组(图 7e~f),具有统计学意义( $P<0.05$ ,表 3)。

表 1 未转染及转染后的 BMSCs 的细胞活力 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Cell viability of untransfected and transfected BMSCs

	BMSCs	
	未转染的 BMSCs Untransfected BMSCs	转染的 BMSCs Transfected BMSCs
1d	0.26±0.19	0.31±0.22
3d	0.32±0.20	0.50±0.24 <sup>①</sup>
5d	0.61±0.26	1.27±0.39 <sup>①</sup>
7d	0.95±0.36	1.53±0.47 <sup>①</sup>

注:①与未转染的 BMSCs 组比较  $P<0.05$

Note: ①Compared with untransfected BMSCs group,  $P<0.05$

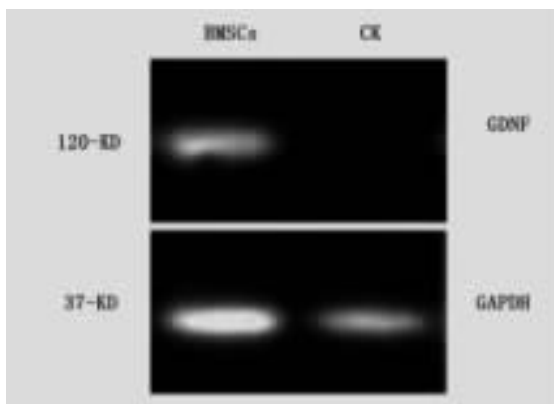


图 5 GDNF 转染 BMSCs 后 GDNF 的凝胶电泳,可见 GDNF 基因转染 BMSCs 7d 后,western-blot 条带中在 120-KD 处出现 GDNF 蛋白痕迹

Figure 5 Gel electrophoresis of GDNF after transfection of GDNF into BMSCs. It can be seen in the figure that after 7 days of BMSCS transfection with GDNF gene, traces of GDNF protein appeared in the western-blot band at 120-KD

**3 讨论**

神经系统损伤后的功能如何恢复,仍然是一个世界性难题。近年来采用神经细胞、干细胞移植治疗神经系统损伤已经逐渐成为研究热点<sup>[7]</sup>。Amemori 等<sup>[8]</sup>研究发现,在脊髓损伤区域移植嗅鞘细胞后,发现移植区域嗅鞘细胞可以分泌神经营养因子以及一些其他的细胞因子,不仅可以使受损的神经元轴突尾部有新的髓鞘形成,而且在脊髓损伤的动物模型中,SCI 后的运动诱发电位幅度从 10mV 降至 7mV, BBB 评分以及足迹分析可见其后肢运动能力有所改善。本研究中,脊髓损伤

表 2 不同组大鼠干预后 BBB 评分结果 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 BBB scores of rats in different groups

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
7d	2.40±0.24	2.70±0.00	2.20±0.18
14d	3.60±0.18	5.80±0.19 <sup>①②</sup>	3.10±0.14
28d	8.30±0.29 <sup>①</sup>	11.9±0.38 <sup>①②</sup>	5.70±0.18

注:①与 C 组比较有显著性  $P<0.05$ ; ②与 A 组比较有显著性  $P<0.05$

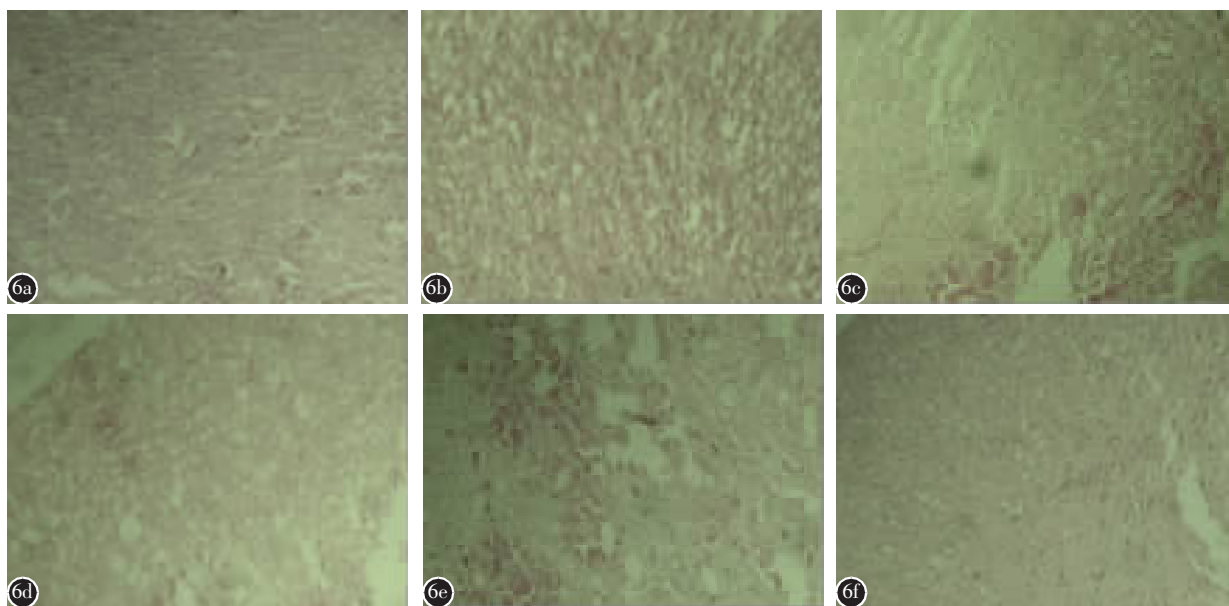
Note: ①Compared with group C,  $P<0.05$ ; ②Compared with group A,  $P<0.05$

后大鼠出现一过性双后肢及尾巴快速抽搐,不能直线行走, BBB 评分明显下降, 说明脊髓功能严重受伤, 脊髓损伤模型建立成功。然而, 随着时间推移, BBB 评分有所回升, 至 28d 时, 三组之间差异具有统计学意义。说明大鼠脊髓损伤后脊髓功能有一定的自主恢复能力。而且 BMSCs 作为移植的干细胞, 因为其本身就对神经损伤恢复有一定的促进作用。将 GDNF 转染 BMSCs 后这一作用得到了进一步增强。

在本研究中, 我们挑选 BMSCs 作为移植的干细胞, 因为其本身就对神经损伤恢复有一定的促进作用。大鼠 BMSCs 被成功地从股骨骨髓中分离并培养出来。在细胞形态学上呈现均匀的成纤维细胞样。流式细胞术结果 BMSCs 高阳性表达 CD29、CD90, 低阳性表达 CD45、CD34 证实了其确实为间充质干细胞。BMSCs 用于实验性大鼠脊髓损伤模型中机制如下: (1) BMSCs 的移植能促

进神经功能再生, 能维持损伤神经细胞的存活, 从而促进神经功能缺损的恢复, 国内学者试验表明, 脑损伤模型大鼠移植 BMSCs 后在血清中存在诸多促进神经修复的再生细胞因子, 利于大鼠神经功能缺损的修复<sup>[9,10]</sup>; (2) BMSCs 的移植有助于促进血管的再生, 能提高内源性血管生成因子的表达, 从而提高血管内皮细胞的增生, 缓解局部缺血、缺氧<sup>[11]</sup>; (3) BMSCs 的抑制则能延缓凋亡的周期, 缓解氧化应激引起的自由基损伤等<sup>[12,13]</sup>; (4) 脊髓损伤的发生、发展属于是一个多因素过程, 其中涉及免疫炎症反应, 该反应是由于浸润的免疫细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞共同作用引起, 能产生炎症介质及细胞因子, 包括: IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-10 及 TGF- $\beta$  等, 而移植 BMSCs 则能减少由于脑梗死引起的炎症因子, 有助于调节机体免疫, 减轻局部免疫炎症反应, 利于神经功能早期恢复<sup>[14,15]</sup>。

神经营养因子主要有神经生长因子 (nerve



**图 6** 细胞治疗后 HE 染色结果(100 $\times$ ) **a** A 组造模后 7d, 大鼠脊髓前角组织中可见大量炎性细胞和空腔 **b** A 组造模后 14d, 大鼠脊髓损伤组织可见少量纤维结缔组织填充 **c** A 组造模后 28d, 大鼠脊髓损伤组织仍可见少量空腔 **d** B 组造模后 7d, 图中可见大鼠脊髓前角组织中大量炎性细胞和空腔 **e** B 组造模后 14d, 可见脊髓损伤组织可见纤维结缔组织填充 **f** B 组造模后 28d, 可见脊髓组织保持相对完整、正常的形态, 空洞范围更小, 局部出血灶减少

**Figure 6** HE staining results after cell treatment (100 $\times$ ) **a** Group A for 7d. A large number of inflammatory cells and cavities were found in the anterior horn tissue of rat spinal cord **b** Group A for 14d. A small amount of fibrous connective tissue can be seen in the spinal cord injury tissue of rats **c** Group A 28d. There were still a few cavities in the injured tissue of rat spinal cord **d** Group B 7d. In the figure, a large number of inflammatory cells and cavities were found in the anterior horn tissue of the spinal cord of rats in group B 7d after modeling **e** Group B for 14d. Fibrous connective tissue filling was seen in spinal cord injury tissue **f** Group B 28d. Compared with group A, the spinal cord tissue in group B remained relatively intact and normal after 28d, with smaller cavity scope and less local hemorrhage focus

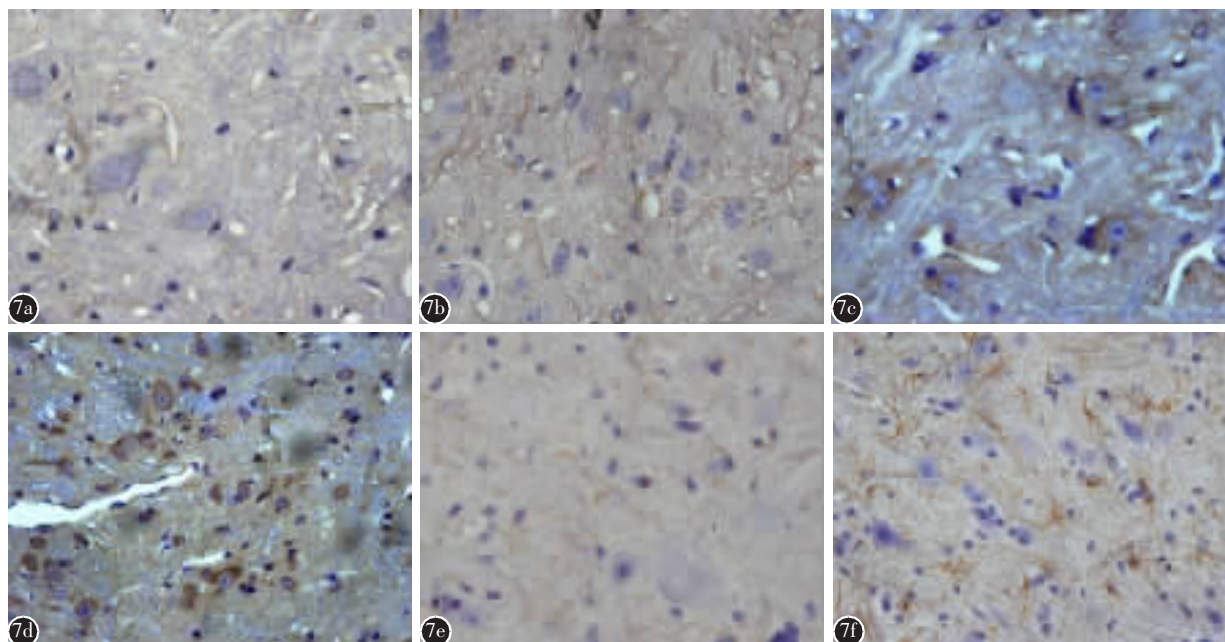


图 7 GFAP、NSE、NF-200 免疫组化染色结果(100×) a GFAP 免疫组化 A 组。可见少量细胞表现为蓝染胞质 b GFAP 免疫组化 B 组。脊髓损伤区可见许多细胞表现蓝染胞质 c NSE 免疫组化 A 组。可见基本无褐染胞质 d NSE 免疫组化 B 组。图中蓝色为细胞核,周围可见大量褐染胞质 e NF-200 免疫组化 A 组。可见细胞核为蓝色,神经纤维为褐色点状 f NF-200 免疫组化 B 组。可见细胞核为蓝色,神经纤维为褐色线状,褐色线状影较 e 明显增多

**Figure 7** Immunohistochemical staining results of GFAP, NSE and NF-200(100×) **a** GFAP immunohistochemistry group A. A small number of cells appear as blue-stained cytoplasm **b** GFAP immunohistochemistry group B. Many cells in the area of spinal cord injury showed blue-stained cytoplasm **c** NSE immunohistochemistry group A. There was basically no brown staining cytoplasm **d** NSE immunohistochemistry group B. The nucleus was shown in blue, surrounded by large amounts of brown-stained cytoplasm **e** NF-200 immunohistochemistry group A. The nuclei were blue and the nerve fibers are brown dots **f** NF-200 immunohistochemistry group B. The nucleus was blue and the nerve fibers were brown linear. The brown linear shadows were significantly increased compared with those in **e**

表 3 未转染及转染后的 BMSCs 的 GFAP、NSE、NF-200 免疫组化染色结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 3** Immunohistochemical staining results of GFAP, NSE, NF-200 in untransfected and transfected BMSCs

	A组 Group A	B组 Group B
GFAP免疫组化光密度 GFAP immunohistochemical optical density	0.13±0.06	0.44±0.29 <sup>①</sup>
NSE免疫组化光密度 NSE immunohistochemical optical density	0.19±0.10	0.52±0.26 <sup>①</sup>
NF-200 染色神经纤维长度(μm) The length of the NF-200 stained nerve fibers	89.98±28.31	23.64±13.45 <sup>①</sup>

注:①与 A 组比较  $P < 0.05$

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

growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因

子 3(neurotrophin-3, NT-3)、胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)。GDNF 由 lin 等<sup>[3]</sup>首先发现,作为一种靶源性神经营养因子,对运动、感觉等神经元起到营养的作用。在神经细胞分化过程中,GDNF 通过 Ras-MAPK 通路刺激神经元的存活和突起的生长,通过 P13K 信息系统诱发神经元片状伪足的形成,后者直接参与神经轴突的发生和多巴胺能神经元的分化。多项研究表明,GDNF 对多种神经元具有营养作用<sup>[16,17]</sup>,在治疗神经系统疾病方面具有良好的应用前景。在我们的研究中发现,GDNF 对 BMSCs 有营养、促进生长的作用,MTT 实验结果显示转染后细胞活力提高,是 GDNF 持续营养,促生长作用占优势的结果。而在大鼠模型中使用 GDNF 转染后的 BMSCs,从 HE 染色中也可以看出 28d 后损伤脊髓组织保持相对完整、正



常的形态,空洞范围更小,局部出血灶减少。

在神经轴突恢复检测方面,NSE 作为神经元特异标志分子之一,通过标记存活神经元数量,可有效说明治疗后脊髓神经损伤有所恢复<sup>[18]</sup>。GFAP 是神经系统星形胶质细胞活化标志物,其参与细胞骨架的构成并维持其张力强度,与神经轴突的形成也密切相关<sup>[19]</sup>。NF-200 是构成神经轴突的主要支架结构<sup>[20]</sup>。当 SCI 后轴突变性、坏死,NF-200 表达量减少,轴突 NF-200 免疫染色变浅。而当脊髓细胞修复时 NF 合成增多,轴突着色增加。本实验初步观察结果表明 GDNF 基因治疗大鼠在伤后 28d 时,轴突 NF 免疫反应阳性增加,提示 GDNF 能促进神经骨架蛋白的修复。这三个指标综合起来,表明本研究移植转染 GDNF 的骨髓间充质干细胞,促进了脊髓神经轴突的再生。

综上所述,GDNF 转染后的 BMSCs 移植对大鼠脊髓损伤后神经功能呈现了积极的保护作用,其机制可能与分泌细胞因子,促进宿主神经元存活,增加局部轴突再生数量有关,为临床研究干细胞移植提供了可靠的实验数据。

#### 4 参考文献

- Fitzharris M, Cripps RA, Lee BB. Estimating the global incidence of traumatic spinal cord injury[J]. *Spinal Cord*, 2014, 52(2): 117-122.
- Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate[J]. *Spinal Cord*, 2014, 52(2): 110-116.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132.
- Kronenberg J, Merkel L, Heckers S, et al. Investigation of neuregulin-1 and glial cell-derived neurotrophic factor in rodent astrocytes and microglia[J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 67(3): 484-493.
- 李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(10): 1721-1725.
- 杨丽, 张荣华, 谢厚杰, 等. 建立大鼠骨髓间充质干细胞稳定分离培养体系与鉴定 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(6): 1064-1068.
- Eckert MJ, Martin MJ. Trauma: spinal cord injury[J]. *Surg Clin North Am*, 2017, 97(5): 1031-1045.
- Amemori T, Jendelova P, Ruzickova K, et al. Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat[J]. *Cytherapy*, 2010, 12(2): 212-225.
- 张琳, 居士明, 王敢, 等. 成纤维细胞生长因子修饰的骨髓间充质干细胞移植对颅脑损伤模型大鼠神经功能的改善机制分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(12): 1137-1140.
- Liu W, Wang Y, Gong F, et al. Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by suppressing the activation of A1 neurotoxic reactive astrocytes[J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(3): 469-484.
- 郭卫春, 李军, 熊敏, 等. 促红细胞生成素动员骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤的作用机制研究进展[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(1): 278-280.
- Bai S, Zhou H, Wu L. Bone marrow stromal cells improved functional recovery in spinal cord injury rats partly via the Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1): 444-448.
- Wang Y, Zhao R, Liu D, et al. Exosomes derived from miR-214-enriched bone marrow-derived mesenchymal stem cells regulate oxidative damage in cardiac stem cells by targeting CaMKII[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 4971261. doi: 10.1155/2018/4971261
- Khoshirat S, Abbaszadeh HA, Ahrabi B, et al. Evaluation of the effect of BMSCs condition media and methylprednisolone in TGF-beta expression and functional recovery after an acute spinal cord injury[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2018, 119(11): 684-691.
- Li Z, Liu F, He X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate inflammation and demyelination of the central nervous system in EAE rats by regulating the polarization of microglia[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 268-280.
- Ibanez CF, Andressoo JO. Biology of GDNF and its receptors-Relevance for disorders of the central nervous system[J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 97(Pt B): 80-89.
- Anastasia A, Wojnacki J, de Erausquin GA, et al. Glial cell-line derived neurotrophic factor is essential for electroconvulsive shock-induced neuroprotection in an animal model of Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2011, 195: 100-111.
- 陈亚南, 王昌铭. 脂蛋白相关性磷脂酶和神经元特异性烯醇化酶在急性脑梗死患者中的动态变化及意义[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2018, 20(3): 290-293.
- Philip DL, Silantyeva EA, Becker ML, et al. RGD-functionalized nanofibers increase early GFAP expression during neural differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(3): 1443-1454.
- Bakovic M, Filipovic N, Ferhatovic HL, et al. Changes in neurofilament 200 and tyrosine hydroxylase expression in the cardiac innervation of diabetic rats during aging[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2018, 32: 38-43.

(收稿日期:2019-02-24 末次修回日期:2019-05-26)

(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)

(本文编辑 姜雅浩)