

· 论 著 ·

人脐血间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤后骨密度的影响研究

张乐 阿良* 李洪秋 张勇

沈阳医学院附属中心医院骨外二科, 沈阳 110024

中图分类号: R651.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 12-1465-04

摘要: **目的** 探讨人脐血间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤后骨密度的影响,为脊髓损伤后骨质疏松的临床治疗奠定基础。**方法** 建立大鼠脊髓损伤模型,48 只 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组(Sham)、脊髓损伤组(SCI)、hUCMSCs 移植组(SCI + hUCMSCs),每组 16 只。分别于术后 0 周、6 周和 12 周应用双能 X 线法测定大鼠腰椎及股骨骨密度。**结果** 0 周时,3 组之间股骨及腰椎骨密度均无明显差异($P > 0.05$);6 周时,与假手术组比较 SCI 组及移植组骨密度均明显下降($P < 0.05$),而移植组较 SCI 组有所改善($P < 0.05$);12 周时,与假手术组比较 SCI 组骨密度明显下降($P < 0.01$),移植组骨密度未见明显降低($P > 0.05$),移植组较 SCI 组明显改善($P < 0.01$)。**结论** hUCMSCs 移植有助于改善大鼠脊髓损伤后股骨及腰椎骨密度, hUCMSCs 移植可能用于治疗脊髓损伤骨质疏松,为脊髓损伤后骨质疏松的治疗提供新思路。

关键词: 脊髓损伤;脐血干间充质细胞;骨密度

Effect of transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells on bone mineral density after spinal cord injury in rats

ZHANG Le, A Liang*, LI Hongqiu, ZHANG Yong

The Second Department of Orthopedics, The Central Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China

Corresponding author: A Liang, Email: aliang36@163.com

Abstract: **Objective** To study the influence of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (hUCMSCs) transplantation in the changes of bone mineral density (BMD) after complete spinal cord injury (SCI), and to provide important data for clinical treatment. **Methods** A total of 48 rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group (Sham), spinal cord injury group (SCI), and SCI + hUCMSCs group. Sixteen rats were in each group. BMD of the lumbar spine and the femur was measured using dual energy X-ray at 0 week, 6 weeks, and 12 weeks after the operation. **Results** At 0 week, BMD of the lumbar spine and the femur among the 3 groups was not significantly different ($P > 0.05$). At 6 weeks, BMD decreased significantly in SCI and SCI + hUCMSCs groups compared with sham operation group ($P < 0.05$). BMD in SCI + hUCMSCs group was improved compared to that in SCI group ($P < 0.05$). At 12 weeks, BMD decreased significantly in SCI group compared with that in sham operation group ($P < 0.01$), but it was not significant in SCI + hUCMSCs group ($P > 0.05$). BMD in SCI + hUCMSCs group was improved than that in SCI group ($P < 0.01$). **Conclusion** Transplantation of hUCMSCs can improve the BMD of the lumbar spine and the femur in rats after complete SCI. It can be used and it provides new idea in the treatment osteoporosis after spinal cord injury.

Key words: Spinal cord injury; Umbilical cord blood mesenchymal stem cells; Bone mass density

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的神经系统疾患,除可引起伤者截瘫,亦导致骨质疏松(osteoporosis, OP),可以显著增加骨折的发生率^[1],且严重阻碍患者的康复进度,带来巨大的经济负担,增加死亡率。然而其病理过程及临床治疗

目前尚不明确,多重因素相互影响导致骨密度(bone mineral density, BMD)变化,虽然相关研究较多,但均未发现有效的治疗手段及改善方法。

脐带血因容易获得、富含干细胞、免疫原性弱、不会引起社会及法律问题等优点而备受瞩目,已有研究应用人脐带血间充质干细胞(human umbilical

*通讯作者: 阿良, Email: aliang36@163.com

cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 治疗 SCI 后神经组织的修复及再生。移植自体、同种异体的骨髓间充质干细胞或基因修饰间充质干细胞等, 可以增加局部骨量, 提高骨密度, 增强骨力学强度, 改善局部骨质疏松情况。而应用 hUCMSCs 改善脊髓损伤后骨质疏松尚无研究。本研究中, 笔者通过在建立大鼠脊髓损伤模型, 移植 hUCMSCs 并检测比较移植后股骨及腰椎骨密度的变化, 探讨移植 hUCMSCs 对脊髓损伤后骨密度的影响, 为进一步临床应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

雌性 10 周龄 SD 大鼠 48 只, 体重 (210 ± 9.8) g, 中国医科大学实验动物部提供, 随机分为 3 组: 假手术组 (Sham)、损伤组 (SCI)、移植组 (SCI + hUCMSCs), 每组 16 只。

1.2 主要试剂

低糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国); 重组粒细胞集落刺激因子 (北京中山生物技术有限公司)。

1.3 模型制作

采用脊髓横断全切术式在第 10 胸椎段横断脊髓制作完全性 SCI 模型。10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 动物俯卧固定, 背部剪毛, 常规消毒后铺无菌孔巾, 以 T10 棘突为中心取背部正中切口, 长约 3 cm, 依次切开皮肤、皮下组织, 剥离椎旁肌, 显露 T9 - T10 棘突及椎板至横突根部。轻轻咬除 T10 节段棘突和两侧椎板, 打开椎管至椎弓根部, 打开硬膜囊, 暴露脊髓上下约 8 mm。以神经剥离子在腹侧硬脊膜与椎管间穿出到对侧, 轻轻挑起硬膜, 在 T10 脊髓节段水平以刀片切断脊髓, 造成脊髓横断的同时有 2 mm 左右的缺损, 然后逐层缝合伤口, 术后肌注庆大霉素 8 万单位。模型制作成功判定标准: 打击后损伤处脊髓出血、水肿, 大鼠出现摆尾反射, 双下肢及躯体回缩样扑动, 麻醉清醒后双下肢呈弛缓性瘫痪。

1.4 hUCMSCs 的制备

新鲜脐带血来源于辽宁省脐血库, 产妇及其家属均知情同意, 乙肝表面抗原和艾滋病抗原检测均为阴性。自脐带抽取新鲜脐带血 50 ~ 60 ml, 放入无菌肝素化 (25 UI/ml) 瓶中保存, 快速送至实验室。用 Hank's 液按 1:4 比例稀释脐带血。先把淋巴细胞分离液放入离心管中, 再将稀释后的脐带血沿管

壁缓缓加入到淋巴细胞分离液上, 最后把离心管放入离心机中, 以 2000 r/min 离心 35 min 一次, 去除最上层黄色淋巴细胞分离液, 小心吸取中间白色的单个核细胞层液, 加入 $0.01 \text{ mol/L pH} 7.4$ 的 PBS 制成单细胞悬液, 以 1000 r/min 速度 10 min 离心洗涤两次, 以 $5 \times 10^6/\text{ml}$ (T-25 培养瓶) 的密度接种于 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37°C 5% CO_2 的培养箱内培养。培养约一周取出, 吸去旧培养基, PBS 液清洗一次, 用 0.05% Trypsin/EDTA 混合液 37°C 消化 10 min, 加入等量的 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 终止胰酶的消化作用, 用吸管轻轻吹打数次, 倒置显微镜下观察细胞已全部脱落, 放入干净的离心管中, 1200 r/min 离心 10 min 一次, 弃上清液, 再用 PBS 液清洗一次, 得到的细胞重悬于 PBS 液, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ 待用。

1.5 hUCMSCs 的移植

用 1 ml 注射器吸取细胞悬液 0.2 ~ 0.3 ml (1×10^6), 取术后 5 天 SCI + hUCMSCs 组的免疫抑制大鼠, 固定后自尾静脉将细胞悬液缓缓注入, 放回笼中喂养。

1.6 骨密度测定

1.6.1 取材: 分别在大鼠术后 0 周、6 周及 12 周进行, 第 0 周时每组随机选取 4 只大鼠, 第 6 周及第 12 周时每组分别随机选取 6 只大鼠, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 球后动脉取血, 全血静置 4 h 后 6000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, -20°C 保存待测。颈椎脱臼处死动物后取第 4 段腰椎及双侧股骨浸泡于生理盐水中, -20°C 保存。

1.6.2 骨密度扫描: 取右侧股骨及第 4 腰椎 (L4), 去除周围的肌肉、韧带等纤维结缔组织, 用 XR-36 双能 X 线骨密度扫描仪 (美国 Norland 公司) 及所附小动物骨密度测试软件, 测定大鼠 L4 及股骨骨密度。扫描速度 60 mm/s , 步距 $1.0 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$ 。

1.7 统计学分析

所得数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件行 t 检验, 组间比较采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

笔者对 SCI 0 周、6 周和 12 周的大鼠进行研究, 发现 3 组之间股骨及腰椎 BMD 均无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 1、图 1; 与假手术组比较, SCI 组 BMD 在 6 周时明显下降 ($P < 0.05$), 股骨及腰椎分别为

(0.1729 ± 0.0233) g/cm^2 、(0.1664 ± 0.0286) g/cm^2 , 见图 2; 在 12 周时下降更加明显 ($P < 0.01$), 股骨及腰椎分别为 (0.1626 ± 0.0278) g/cm^2 、(0.1483 ± 0.0256) g/cm^2 , 见图 3。

表 1 0 周、6 周、12 周时 3 组股骨及腰椎骨密度 ($n = 16, \text{g}/\text{cm}^2$)

Table 1 BMD of the femur and the lumbar spine in 3 groups at 0 week, 6 weeks, and 12 weeks ($n = 16, \text{g}/\text{cm}^2$)

Group	0 week		Six weeks		Twelve weeks ***	
	Femur	Lumber	Femur	Lumber	Femur	Lumber
Sham	$0.2031 \pm 0.0234^*$	$0.1988 \pm 0.0221^*$	$0.2029 \pm 0.0370^\#$	$0.1972 \pm 0.0189^\#$	$0.2017 \pm 0.0356^\ddagger$	$0.1969 \pm 0.0289^\ddagger$
SCI	0.2025 ± 0.0204	0.1976 ± 0.0197	$0.1729 \pm 0.0233^\Delta$	$0.1664 \pm 0.0286^\Delta$	$0.1626 \pm 0.0278^\Delta$	$0.1483 \pm 0.0256^\Delta$
SCI + hUCMSCs	0.2027 ± 0.0198	0.1963 ± 0.0242	0.1889 ± 0.0321	0.1849 ± 0.0244	0.1953 ± 0.0189	0.1904 ± 0.0164

Note: * $P > 0.05$ vs other groups; $^\#P < 0.05$ vs other groups; $^\Delta P < 0.05$ vs SCI + hUCMSCs group; $^\Delta P < 0.01$ vs other groups; $^\ddagger P > 0.05$ vs SCI + hUCMSCs group.

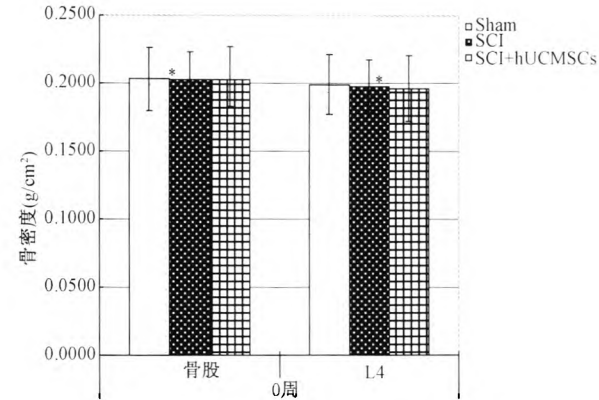


图 1 0 周时 3 组股骨及腰椎骨密度比较

Fig. 1 Comparison of BMD of the femur and the lumbar spine among 3 groups at 0 week

Note: * $P > 0.05$ vs other groups.

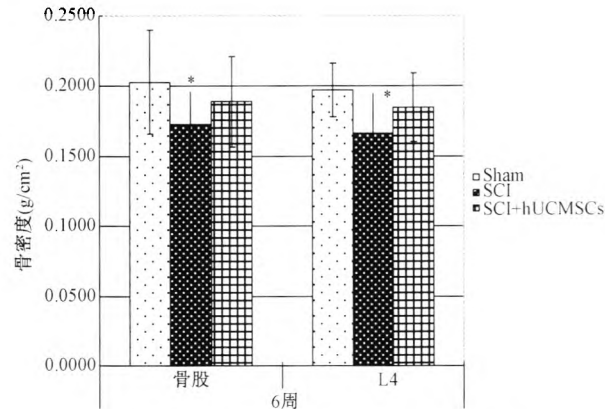


图 2 6 周时 3 组股骨及腰椎骨密度比较

Fig. 2 Comparison of BMD of the femur and the lumbar spine among 3 groups at 6 weeks

Note: * $P < 0.05$ vs other groups.

6 周时与假手术组比较, 移植组 BMD 明显下降 ($P < 0.05$), 见表 1、图 2, 股骨及腰椎分别为 (0.1889 ± 0.0321) g/cm^2 、(0.1849 ± 0.0244) g/cm^2 ; 而高于 SCI 组 BMD, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。12 周时与

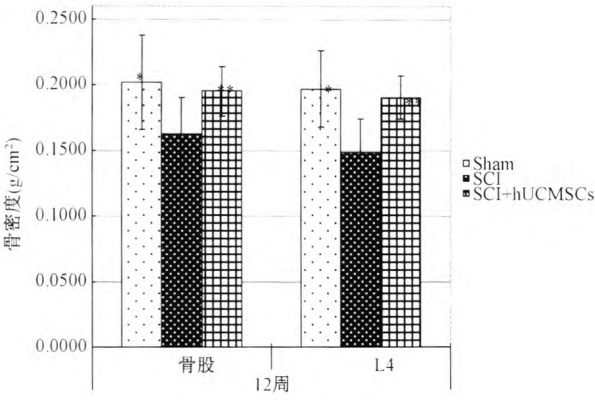


图 3 12 周时 3 组股骨及腰椎骨密度比较

Fig. 3 Comparison of BMD of the femur and the lumbar spine among 3 groups at 12 weeks

Note: * $P < 0.01$ vs other groups; ** $P > 0.05$ vs SCI + hUCMSCs group.

假手术组比较, 移植组 BMD 未见明显降低 ($P > 0.05$), 见表 1、图 3, 股骨及腰椎分别为 (0.1953 ± 0.0189) g/cm^2 、(0.1904 ± 0.0164) g/cm^2 ; 而高于 SCI 组 BMD, 差异显著性更加明显 ($P < 0.01$)。

3 讨论

SCI 是一种严重的神经系统损伤, 虽然相关研究报道很多, 目前临床上尚未发现完全治愈 SCI、使其达到结构及功能恢复的治疗方法, 已有的神经营养因子等促进神经细胞再生的方法效果有限^[2-4], 预后也没有根本改观。骨质疏松是 SCI 后严重并发症之一, 骨量在损伤 6 个月内大量丢失, 损伤后 1~5 年的时间内骨的丢失量就可以达到病理骨折的临界值, 可以显著增加骨折的发生率^[1]。不仅给患者家庭带来巨大的经济负担, 还严重阻碍了患者的康复进度, 增加了死亡率。因此 SCI 后骨质疏松须引起重视, 然而其病理过程及临床治疗目前尚不明确^[5]。多重因素相互影响导致骨密度变化, 因此要

辨别单一因素对其影响是复杂和困难的。近年来,关于 SCI 与骨质疏松的机制及治疗方法的相关研究很多,但仍无明确、统一的结论。

骨质疏松以骨量丢失,骨显微结构破坏为特征,因此 BMD 已成为评价骨质疏松的“金指标”,其检测对于骨质疏松症的诊断、预测骨折风险及监测疗效有重要作用^[6]。Dionyssiotis Y 及 Rittweger J 等^[7-9]研究均表明脊髓损伤后骨密度呈现明显下降趋势。本研究中 SCI 组与假手术组比较股骨及腰椎 BMD 呈下降趋势亦与该结果符合。

近年来,越来越多的研究提示干细胞移植为 SCI 的再生和修复提供了可能。脐带血因容易获得、富含干细胞、免疫原性弱、不会引起社会及法律问题等而备受瞩目。在不同诱导条件下,hUCMSCs 可以跨胚层分化为骨细胞、脂肪细胞及神经细胞等^[10-11],加之无伦理学等问题,是细胞移植理想的种子细胞。比较骨髓和外周血,脐血中含有较多的更为原始的造血细胞,在功能上也存在差异。hUCMSCs 在体外形成集落的能力、对生长因子刺激的敏感性 & 刺激后进入细胞周期的速度均强于骨髓及外周血。hUCMSCs 还具有自分泌造血因子的能力,可赋予其高增殖和扩增能力。其端粒长度比骨髓及外周血干/祖细胞的端粒长,故寿命更长,这可能是高增殖及扩增潜能的机制之一。脐血中的 T 淋巴细胞中以未接触抗原刺激的天然 T 细胞为主,分泌细胞因子的能力低下,树突状细胞功能相对不成熟,以诱导免疫耐受为主。因此脐血免疫应答低下,故而移植后同种移植排斥反应发生率和严重程度均较低。许多研究已经证明 hUCMSCs 具有成骨分化的潜能^[12]。Reeva Aggarwal 及 Lee JH 等^[13-14]发现,由脐血组织诱导形成的 CD34⁺ 细胞可以明显增加骨沉积及骨密度并改善骨的微结构,同时可以阻碍破骨细胞的分化、成熟及功能。组织学及免疫学研究表明,hUCMSCs 植入大鼠骨组织的免疫原性较低,增殖及定位能力使其可以用来治疗局部骨缺损^[15]。应用 hUCMSCs 改善脊髓损伤后骨质疏松尚无研究,在本研究中 6 周时移植组与 SCI 组比较,BMD 下降较少,12 周时移植组 BMD 与假手术组比较未见明显降低,移植组较 SCI 组明显改善。由此说明采用 hUCMSCs 移植治疗提高了 SCI 后大鼠的骨密度,可能有助于骨质疏松的治疗。

本研究是存在局限性的,骨质疏松以骨量丢失,骨显微结构破坏为特征,其中骨密度的降低是由于成骨细胞分化和骨形成的下降或者破骨细胞功能的

增强所致,而本文未对 hUCMSCs 移植改善骨密度的机制及对骨显微结构的影响进行探究,在未来的研究中将借助显微 CT 等方法对其做进一步的深入研究,为骨质疏松的治疗提供新的思路。

【参 考 文 献】

- [1] Zhang TT. Research progress in the correlation between spinal cord injury and osteoporosis. Chin J Osteoporos, 2012, 18 (5): 479-482.
- [2] Cao Q, He Q, Wang Y, et al. Transplantation of ciliary neurotrophic factor-expressing adult oligodendrocyte precursor cells promotes remyelination and functional recovery after spinal cord injury. J Neurosci, 2010, 30 (8): 2989-3001.
- [3] Bonner JF, Connors TM, Silverman WF, et al. Grafted neural progenitors integrate and restore synaptic connectivity across the injured spinal cord. J Neurosci, 2011, 31 (12): 4675-4686.
- [4] Wang G, Ao Q, Gong K, et al. Synergistic effect of neural stem cells and olfactory ensheathing cells on repair of adult rat spinal cord injury. Cell Transplant, 2010, 19 (10): 1325-1337.
- [5] Gifre L, Vidal J, Carrasco J, et al. Effect of recent spinal cord injury on Wnt signaling antagonists (sclerostin and Dkk-1) and their relationship with bone loss. J Bone Miner Res, 2015, 30 (6): 1014-1021.
- [6] He YX, Wei QZ, Xiong QL, et al. Research progress of the relationship between osteoporotic fractures and bone mineral density. Chin J Osteoporos, 2014, 20 (2): 219-224.
- [7] Dionyssiotis Y. Spinal cord injury-related bone impairment and fractures: an update on epidemiology and physiopathological mechanisms. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2011, 11 (3): 257-265.
- [8] Rittweger J, Simunic B, Bilancio G, et al. Bone loss in the lower leg during 35 days of bed rest is predominantly from the cortical compartment. Bone, 2009, 44 (4): 612-618.
- [9] Suga S, Goto S, Togari A. Demonstration of direct neurite-osteoclastic cell communication in vitro via the adrenergic receptor. J Pharmacol Sci, 2010, 112 (2): 184-191.
- [10] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smimov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells, 2003, 21 (1): 105-110.
- [11] Antebi B, Pelled G, Gazit D. Stem cell therapy for osteoporosis. Curr Osteoporos Rep, 2014, 12 (1): 41-47.
- [12] Liu G, Li Y, Sun J. In vitro and in vivo evaluation of osteogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on partially demineralized bone matrix. Tissue Eng Part A, 2010, 16 (3): 971-982.
- [13] Aggarwal R, Lu J, Kanji S, et al. Human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells reverse osteoporosis in NOD/SCID mice by altering osteoblastic and osteoclastic activities. PLoS One, 2012, 7 (6): e39365.
- [14] Lee JH, Hah YS, Cho HY. Human umbilical cord blood-derived CD34-positive endothelial progenitor cells stimulate osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived osteoblasts. Tissue Eng Part A, 2014, 20 (5-6): 940-953.
- [15] Qu Z, Guo L, Fang G. Biological characteristics and effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) grafting with blood plasma on bone regeneration in rats. Cell Biochem Biophys, 2012, 63 (2): 171-181.

(收稿日期: 2015-04-16)