

干细胞研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000233

神经干细胞植入大鼠缺损皮肤对创面神经修复的影响

汪正燕, 果磊, 蒲晓姝, 张敏珠, 王灿, 李茂华

(1. 重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科, 重庆 400016; 2. 重庆市急救医疗中心整形颅颌面外科, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)体外诱导大鼠骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化为神经干细胞(neural stem cells, NSCs)后, 植入缺损皮肤对创面神经修复的作用及方式。**方法:**分离培养 SD 大鼠 BMSCs, 利用 aFGF 诱导其向 NSCs 分化, 并用 DAPI 荧光标记物进行标记。将 81 只 SD 大鼠背部作皮肤全层缺损创面, 每组 9 只。随机分为局部创面注射 NSCs(A)组、尾静脉注射 NSCs(B)组、NSCs+血浆支架(局部外敷料组)(C)组、局部创面注射 BMSCs(D)组、尾静脉注射 BMSCs(E)组、BMSCs+血浆支架组(局部外敷料组)(F)组、血浆支架(局部外敷料)(G)组、局部创面注射等量生理盐水(H)组、尾静脉注射等量生理盐水(I)组, 创面模型在各种移植处理后的第 4、5、7 周取材, 免疫荧光及 RT-PCR 检测皮肤表皮下及真皮层蛋白基因产物(protein gene product, PGP)9.5 的表达。**结果:**PGP 9.5 在创面愈合后第 4、5、7 周的荧光密度分布, 在时间上采用重复资料分析, 差异有统计学意义($F=427.03, P=0.000$), 干细胞移植对神经修复特异性表达有差异; 在分组上采用重复资料分析, 差异有统计学意义($F=130.44, P=0.000$), 干细胞移植在时间及分组上的相互作用结果差异有统计学意义($F=3.543, P=0.001$)。NSCs 局部注射移植后神经修复作用较 NSCs 尾静脉注射移植明显($P=0.001$), NSCs 尾静脉注射移植后神经修复较 NSCs 外敷料移植明显($P=0.000$), 而 NSCs 局部注射移植后神经修复作用较 BMSCs 局部注射移植后明显($P=0.000$), BMSCs 局部注射移植后神经修复作用较生理盐水局部注射移植后明显($P=0.000$), 血浆局部外敷料移植与生理盐水的局部注射移植之间差异有统计学意义($P=0.014$), 生理盐水的局部注射移植与尾静脉注射移植之间差异无统计学意义($P=0.446$), RT-PCR 检测 PGP 9.5 基因表达的测定更进一步说明了以上结果。**结论:**aFGF 诱导 BMSCs 分化为 NSCs 后, 植入皮肤缺损促进皮肤创面神经修复的效果较单纯植入 BMSCs 强, 且以局部注射效果最为显著。

【关键词】酸性成纤维细胞生长因子; 骨髓间质干细胞; 神经干细胞; 皮肤创面; 细胞治疗; 神经再生

【中图分类号】R62

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-29

Effects of neural stem cell transplantation on neural regeneration in rats' skin wounds

Wang Zhengyan, Guo Lei, Pu Xiaoshu, Zhang Minzhu, Wang Can, Li Maohua

(1. Department of Burn and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Plastic and Cranial Maxillofacial Surgery, Chongqing First-Aid Medical Center)

【Abstract】Objective: To observe the effects of neural stem cells (NSCs) in vivo on neural regeneration in skin wounds after acidic fibroblast growth factor(aFGF) being used to induce rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) into neural stem cells(NSCs) in vitro. **Methods:** SD rat BMSCs were isolated and cultured by the whole bone marrow adherent culture method, induced by aFGF to differentiate into NSCs, and was marked with DAPI. Eighty-one SD rats were made back full-thickness defect skin wounds and each group had 9 SD rats. NSCs were randomly divided into the local wound injection(group A), the tail vein injection(group B), the NSCs with plasma graft implantation(group C). BMSCs were divided into the local wound injection(group D), the tail vein injection of(group E), BMSCs with plasma graft implantation(group F), the plasma graft transplantation(group G). Tail veins were injected with normal saline(group H) and local wounds were injected with normal saline(group I). The expression of protein gene product(PGP) 9.5 in wound skin after transplantation at the 4th, 5th, 7th week was detected by immunofluorescence and RT-PCR in order to reflect the skin nerve regeneration. **Results:** There were statistically significant differences in fluorescence density value of PGP 9.5 at the 4th, 5th, 7th week after the wound healing based on the results of repeated data analysis of design information($F=27.03, P=0.000$). There

were differences in specific expression of nerve restoration after

stem cell transplantation based on the results of repeated data

analysis of design information($F=130.44, P=0.000$). The inter-

action of stem cell transplantation in terms of time and group

was statistically significant($F=3.543, P=0.001$). Local injection

of NSCs transplantation significantly improved nerve restoration than tail vein injection of NSCs transplantation ($P=0.001$). Tail vein injection of NSCs transplantation significantly improved nerve restoration than NSCs plasma graft transplantation ($P=0.000$). Local injection of NSCs transplantation significantly improved nerve restoration than local injection of BMSCs transplantation ($P=0.000$). Local injection of BMSCs transplantation significantly improved nerve restoration than local injection of saline transplantation ($P=0.000$). There were statistically significant differences between local plasma graft transplantation and local injection of saline transplantation ($P=0.014$) and there was no difference between local injection of saline transplantation and tail vein injection transplantation ($P=0.446$). Detection of PGP 9.5 with RT-PCR further illustrated the above results. **Conclusion:** NSCs transplanted into skin wounds in the local wound injection can promote the neural regeneration of wound and it was the most effective pattern.

【Key words】nerve regeneration;neural stem cells;skin wounds;cell therapy;acidic fibroblast growth factor

皮肤全层受损后往往导致皮下神经纤维、神经末梢、感受器功能丧失,即便恢复也不完全,创面愈合出现感觉迟钝或者过敏等感觉异常表现,严重影响患者生活质量。有学者在特定培养条件下将骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化为神经干细胞(neural stem cells, NSCs)及神经元等^[1-2],为神经损伤后的再生研究提供了一个生物学模型,对神经损伤修复具有重要意义。近年来,国内外用干细胞修复周围神经损伤倍受重视^[1,3]。Hofstetter 等^[4]对动物脊髓损伤模型行 BMSCs 脊髓内移植,在移植区和瘢痕组织之间发现新生神经纤维束。内源性神经干/祖细胞在中风后可产生新神经元,NSCs 分化为神经元而修复神经系统^[5]。目前国内鲜有皮肤损伤后神经再生机制、影响因素及如何促进神经修复的研究报道。本研究利用酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)体外诱导大鼠 BMSCs 分化为 NSCs 后,移植于全层皮肤缺损创面,观察其对皮肤神经再生修复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~6 月 SPF 级 SD 大鼠,雌雄不拘,体质量(220 ± 3) g,重庆市医学实验动物中心提供[动物合格证号:SCXK(渝)2007-0001]。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养液(Hyclone 公司),胎牛血清(FBS, Gibco 公司),aFGF、B27(Peprotech 公司),兔抗大鼠单克隆抗体蛋白基因产物(protein gene product, PGP)9.5(Epitomics 公司),DAPI 荧光标记物(北京索来宝科技有限责任公司),FITC 标记山羊抗兔 IgG(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司),RNA 提取试剂(Trizol)(购自大连 TaKaRa 公司)。

1.3 大鼠 BMSCs 体外分离、培养与纯化

大鼠 BMSCs 培养体外分离、培养与纯化,见参考文献[6]。

1.4 NSCs 的体外诱导

利用 aFGF 将 BMSCs 体外诱导成 NSCs,见参考文献[6]。

1.5 获取 DAPI 标记已诱导成功的 NSCs

在移植前 1 d 标记。弃去 NSCs 培养瓶中的培养基,用无血清的 DMEM/F12 洗涤 2 次,向待移植的细胞培养皿中加入 DAPI 工作液 1 ml,注意避光,无菌操作。培养液中 DAPI(终浓度 50 $\mu\text{g/ml}$)孵育过夜后换液,使用 PBS 洗涤细胞至少 6 次,以去除未与细胞结合的 DAPI,以 2.5 g/L 胰酶消化收集细胞备用。

1.6 NSCs 移植物的构建

将 10 ml 人血浆、13 ml 生理盐水、10 mg 氨甲环酸放入 50 ml 离心管中,添加 1×10^5 个 DAPI 标记的细胞,涡轮机混匀细胞团,均匀分布在血浆中,滴加 2% 的氯化钙 2 ml,混匀后倒入直径为 10 cm 的培养皿,放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱 30 min 后形成凝胶状态,然后加含有 1% FBS 和 2% B27 的 DMEM/F12 的培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 4~5 d,显微镜下观察细胞融合成片。移植前用干纱布吸尽凝胶表面上的水分,使之成膜状。同法制作 BMSCs 及无细胞的血浆支架作为对照。

1.7 细胞移植分组

81 只 SD 大鼠随机数字表法分为实验组:局部创面注射 NSCs(A1~9 组)、尾静脉注射 NSCs(B10~18 组)、NSCs+血浆支架组(局部外敷料)(C19~27 组);阳性对照组:局部创面注射 BMSCs(D28~36 组)、尾静脉注射 BMSCs(E37~45 组)、BMSCs+血浆支架组(局部外敷料)(F46~54 组)、血浆支架组(局部外敷料)(G55~63 组);阴性对照组:局部创面注射等量生理盐水(H64~72 组)、尾静脉注射等量生理盐水(I73~81 组)(每组 9 只)。

1.8 造模(全层皮肤缺损创面)

10%水合氯醛 4 ml/100 g 进行麻醉,用 8%的 Na_2S 进行背部皮肤的脱毛,在其背部脊柱一侧旁开 1 cm 的切口,手术刀片切除全层皮肤,形成一个直径 1.8 cm、面积 2.54 cm^2 的圆形创面。凡士林纱布覆盖创面,打包固定包扎。将大鼠进行随机分组。造模当天即根据以下步骤进行处理。术后置于干净笼内单独正常喂饲,注意观察记录创面出血和全身状况。

1.9 SD 大鼠 NSCs 体内移植

实验组大鼠 NSCs 按照局部创面注射移植(多点皮内注射)、尾静脉注射、干细胞+血浆支架组移植(局部外敷料)3 种方式将 DAPI 标记的 NSCs 单细胞悬液(2×10^{10} 个/0.1 ml)移植入大鼠体内。阳性对照组大鼠 BMSCs 按照同样的方式移植。阴性对照组大鼠则移植等体积的生理盐水。前期工作已做干细胞在移植后 1、2 周后,取大鼠背部创面周围的新鲜组织置于液氮中迅速冷冻保存,行连续冰冻切片。荧光显微镜下 100 倍观察 DAPI 阳性细胞,以检测干细胞在局部存活及迁移情况,为创面模型在各种移植处理后的 4、5、7 周评价神经修复的检测做准备。

1.10 皮肤神经再生评估

观察创面的愈合情况,所有大鼠创面模型在各种移植后,第 4、5 及 7 周分批麻醉处死动物,切取愈合面组织,每份标本分为 2 份,1 份行免疫荧光检测皮肤神经标志物 PGP 9.5,另 1 份行 RT-PCR 法检测 PGP 9.5 mRNA 的表达,免疫荧光的具体操作方法:标本行 40 g/L 甲醛固定,50%蔗糖脱水,制作连续冰冻切片,在室温下晾干,用石蜡将组织包裹好,在 PBS 中漂洗 3 次,每次 5 min,用 0.1% triton 进行破膜处理,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。用 10%正常山羊血清封闭,在 37 °C 水浴箱中水浴 30 min,滴加 PGP 9.5 一抗(1:100)在 4 °C 冰箱中过夜,第 2 天取出放入水浴箱中水浴 1 h。PBS 中漂洗 3 次,每次 5 min,避光条件下滴加 FITC 标记的山羊抗兔二抗(1:100)后避光 1 h。PBS 中漂洗 3 次,每次 5 min。甘油封片,荧光显微镜观察。新生的神经纤维呈现绿色的光点。每一张切片选择 5 个随机视野进行观察,计算阳性细胞数及均数。

1.11 RT-PCR 法检测 PGP 9.5 mRNA 的表达

1.11.1 实验标本 RT-PCR 的萃取 将收集的另一份动物标本,放于液氮中,在 -80 °C 温度下进行保存,取出标本放入离心管中,做好标记,每管中加入 Trizol 0.3 ml/L,超声破碎,再加入氯仿 0.05 ml,室温孵育 15 min,12 000 r 离心 15 min (4 °C),将无色上相转移至 0.5 ml 离心管中,加入异丙醇 0.15 ml 混匀,室温孵育 10 min,12 000 r/min 离心 10 min (4 °C),弃上清,加入体积分数为 75%的乙醇 0.3 ml 涡旋,7 500 r/min 离心 5 min (4 °C),弃上清,用 DEPC 水再悬 RNA 白色沉淀物,60 °C 水浴 15 min。用 DV-640 紫外分光光度计定量后分装,-80 °C 保存。

1.11.2 RT-PCR 逆转录试剂盒 购自上海生工,按说明书操作。PCR 引物由上海生工合成,GAPDH 上游 5'-GTGCT-GAGTATGTCGTGGAGTCT-3',下游 5'-GAGTGGGAGTTGC-TGTTGAAGT-3(602 bp);PGP 9.5 上游 5'-GCTGAAACCGA-TGGAGATTAAC-3',下游 5'-CCTCGTTCTTCTCGAAACACTT-3'(407 bp)。反应条件为:94 °C 预变性 3 min,94 °C 30 min,60 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环后,72 °C 延伸 10 min。PCR 产物检测采用 1.1%琼脂糖电泳 GODENVIEW 染色法,取 10 μ l PCR 产物和上样缓冲液混匀后点样,电泳,恒压 100 V,30 min 后经电泳后用图像分析仪扫描,凝胶图像分析系统,对电泳条带进行光密度分析。

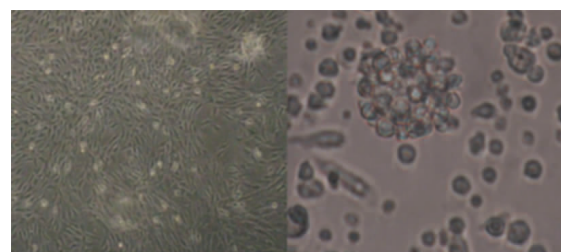
1.12 统计分析

实验图片及数据的处理由 GraphPad Prism 5,ImageJ,Quantity One 软件进行分析和处理,统计软件:SPSS Statistics V16.0。创面愈合皮肤 PGP 9.5 荧光密度采用重复测量设计资料方差分析;RT-PCR 检验 PGP 9.5 基因表达采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

原代及传代细胞:骨髓单个核细胞原代培养 24 h 后,部分细胞开始贴壁生长。培养 3 d 弃去悬浮细胞后,贴壁细胞生长加快。培养至第 7 天可见细胞呈扁梭形或多角形,随着细胞密度的增高,细胞呈长梭形平行排列或呈漩涡状排列。此后将传至第 3 代的 BMSCs 接种于 25 ml 的培养瓶内,用 NSCs 培养基(含 B27,aFGF)抗贴壁诱导培养,成功地将 BMSCs 诱导为 NSCs 并形成神经球(图 1)。



A. P3 代 BMSCs (100 $\times$) B. 诱导 3 d 后形成的神经球样细胞团 (400 $\times$)

图 1 大鼠 BMSCs 诱导前后的形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of rat BMSCs before and after the induction

2.2 细胞迁移及体内分化

在体外用 DAPI 标记 NSCs 及 BMSCs,标记率为 100%。移植 1 周后在背部创面处及其周边部位可见到 DAPI 标记的干细胞,2 周时细胞逐渐在皮肤内迁移。DAPI 标记的是细胞核,其在 356 nm 波长激光下发出蓝色荧光(图 2)。

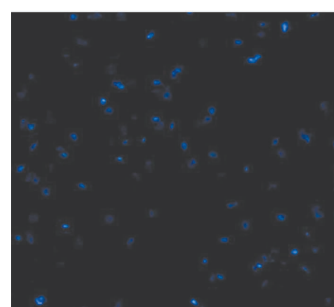


图 2 DAPI 标记的 NSCs 在移植缺损创面 2 周时细胞在皮肤内的分布 (200 $\times$)

Fig.2 Transplantation of NSCs cells labeled by DAPI into skin lesions and its distribution on the 2nd week (200 $\times$)

2.3 创面愈合皮肤 PGP 9.5 荧光密度

PGP 9.5 作为创面神经修复的特异性标记物,在显微镜 400 倍下直接表现为绿色荧光点(图 3),采用 GraphPad Prism 5 数据分析及直观分布图,实验 A 组造模处理后第 4、5、7 周表皮下及真皮层 PGP 9.5 荧光密度高于实验 B 组(图 4),同时高于同种移植途径不同移植细胞的阳性对照 D 组,实验 B 组高于 C 组,阳性对照 D、E 组高于实验 C 组,但均高于阴性对照 H、I 组。具体如表 1。NSCs 局部注射移植后神经修复作用较 NSCs 尾静脉注射移植明显($P=0.001$),NSCs 尾静脉注射移植后神经修复较 NSCs 外敷料移植明显($P=0.000$),而 NSCs 局部注射移植后神经修复作用较 BMSCs 局部注射移植后明显($P=0.000$),BMSCs 局部注射移植后神经修复作用较生理盐水局部注射移植后明显($P=0.000$),血浆局部外辅

料移植与生理盐水的局部注射移植之间有统计学意义($P=0.014$),生理盐水的局部注射移植与尾静脉注射移植之间无统计学意义($P=0.446$)(图 4)。

2.4 RT-PCR 检测 PGP 9.5 基因表达的测定

PGP 9.5 mRNA 在第 7 周的标本中检测灰度值为:A 组为 0.8087 ± 0.0241 、B 组为 0.6947 ± 0.0171 、C 组为 0.5105 ± 0.0329 、D 组为 0.6062 ± 0.0199 、E 组为 0.5129 ± 0.0274 、H 组为 0.3893 ± 0.0246 、G 组为 0.1953 ± 0.0189 ,差异有统计学意义($F=4.067, P=0.041$)。组间两两比较进行 LSD- t 检验时($P=0.000$)。PGP 9.5 在神经局部注射移植高于尾静脉注射移植组,局部注射移植高于外辅料移植组,尾静脉注射移植高于外辅料移植组,神经干细胞移植高于骨髓间充质干细胞移植组,神经干细胞移植高于血浆移植组,骨髓间充质细胞

表 1 各组创面愈合后第 4、5、7 周测量 PGP9.5 免疫荧光平均密度分布 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Average expression of protein gene product 9.5(PGP9.5) in healed skin at the 4th,5th,7th week detected by immunofluorescence ($\bar{x} \pm s$)

标本收集时间	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组	G 组	H 组	I 组
第 4 周	16.84 ± 1.23	15.49 ± 1.66	11.99 ± 1.88	13.88 ± 0.54	12.78 ± 0.61	7.64 ± 1.56	4.25 ± 0.84	3.52 ± 1.01	3.25 ± 1.12
第 5 周	25.29 ± 0.80	20.71 ± 1.73	14.24 ± 1.98	19.28 ± 0.53	15.80 ± 1.93	12.95 ± 2.24	7.88 ± 1.13	4.25 ± 0.84	4.98 ± 0.42
第 7 周	28.88 ± 1.45	25.24 ± 0.69	19.64 ± 0.86	22.85 ± 0.42	20.47 ± 1.26	17.18 ± 1.43	14.25 ± 1.15	11.5 ± 1.42	10.6 ± 1.48

注:荧光密度 PGP 9.5 在创面愈合后第 4、5、7 周分布,采用重复资料分析,时间因素差异有统计学意义($F=427.03, P=0.000$),干细胞随着时间的推移神经修复特异性表达有差异;分组因素差异有统计学意义($F=130.44, P=0.000$);干细胞移植在时间及分组上的相互作用结果有统计学意义($F=3.543, P=0.001$)

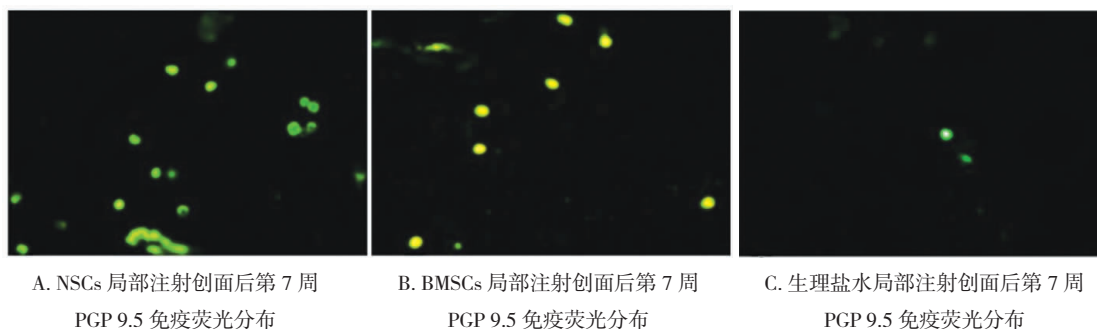


图 3 NSCs, BMSCs 及生理盐水局部注射创面后第 7 周 PGP 9.5 免疫荧光分布 (400 $\times$)

Fig.3 Expression of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) of NSCs, BMSCs and normal saline local injection in healed skin at the 7th week detected by immunofluorescence (400 $\times$)

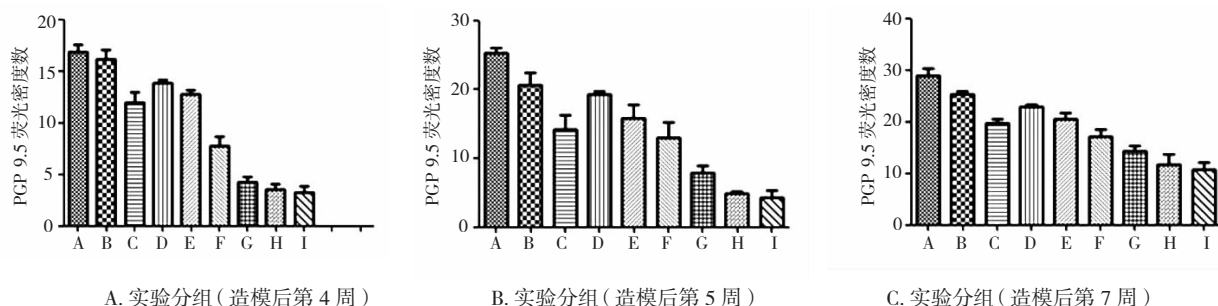


图 4 造模处理后第 4、5、7 周真皮下 PGP 9.5 的荧光密度数

Fig.4 Fluorescent density of PGP 9.5 in wound skin after transplantation at the 4th,5th,7th week

移植高于血浆移植组。阴性对照生理盐水组不表达(图 5、图 6)。

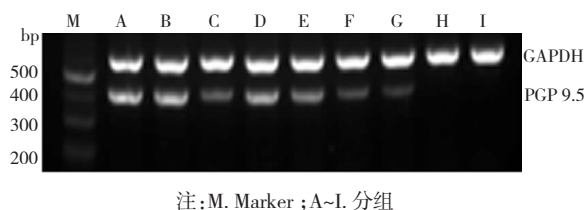


图 5 造模处理后第 7 周 PGP 9.5 mRNA 的表达量

Fig.5 Fluorescence density value of PGP 9.5' s mRNA in wound skin after transplantation at the 4th week

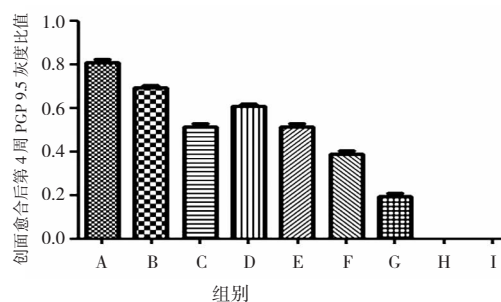


图 6 造模处理后第 7 周 PGP 9.5 mRNA 灰度比较值

Fig.6 Grey ratio of PGP 9.5 mRNA after transplantation at the 7th week

3 讨论

周围神经的修复一方面通过健存的神经轴突延伸长入;另一方面可能是通过局部的干细胞增殖、分化而来。皮肤创面在有利于轴突延伸的环境或者干细胞向神经组织分化的条件下,才可能促进创面神经再生修复。有研究证实干细胞移植可促进受损周围神经干的修复和受损神经所支配的组织器官功能的部分恢复^[7-8]。NSCs 可分化为神经元与少突胶质细胞,进而促进受损的脊髓修复^[9]。国外已经做了较多的 NSCs 移植到移植脊柱病变和中风的模型中,并能整合到宿主组织^[10-13]。NSCs 在移植后可上调脑源性神经营养因子基因的表达,可以释放特定因子,促进其生存,防止已植入的细胞死亡,这些因子还增加了神经营养因子的生物利用度,是其修复脊髓损伤的机制之一^[14-15]。

本实验前期已完成大鼠 BMSCs 的提取分离、培养、纯化、鉴定及向 NSCs 分化的实验研究,结果显示:选用 80 ng/ml aFGF 诱导 BMSCs 6 h 后细胞胞体收缩,折光性强,细胞呈双极或多极状,诱导 6 d 后

细胞间的突起相互连接,交织成网,变为典型的神经元样细胞形态。免疫荧光染色显示 Nestin、NSE 表达阳性,aFGF 成功诱导 BMSCs 分化为 NSCs^[6]。

本实验参照了柯昌能等^[3]技术项目中的干细胞标记及移植方式,并做了相应改进。结果表明,移植 14 d 后显微镜下能够观察到 DAPI 标记的干细胞蓝色荧光,说明移植干细胞在创面中成活。创面愈合皮肤 PGP9.5 荧光密度的柱状图和荧光点分布图,说明了实验 A 组造模处理后第 4、5、7 周表皮下及真皮层 PGP 9.5 荧光密度高于实验 B 组,可能因为局部注射相较尾静脉更容易达到细胞高浓度,通过旁分泌的形式,达到神经纤维修复的局部微环境;自身分化为神经纤维的细胞数也较多。实验 A 组 PGP 9.5 荧光密度高于阳性对照 D 组,说明了 NSCs 在同种移植途径上,相较于 BMSCs 更能促进神经纤维的修复,BMSCs 在 aFGF 诱导分化为 NSCs 后,BMSCs 由于可分化为多种细胞,相较于 NSCs,在同种移植方式同样移植数量的情况下,目标明确,直接分化为神经纤维,促进神经的修复。实验组 PGP 9.5 荧光密度总体趋势高于阳性对照 D、E 组,阳性对照 D、E 组又高于实验 C 组,这可能是因为局部注射和尾静脉相较局部敷料更能达到细胞高浓度。

不同移植方式结果比较,局部注射途径是一种简单有效的移植方式,直接作用于创面,可提高细胞靶向治疗浓度和效能,效果优于尾静脉移植及局部敷料移植。随着时间的延长,这种优势越来越明显。第 5、7 周时阳性对照 G 组高于阴性对照 H、I 组,血浆对创面神经有一定的修复作用,但修复效果不明显。同样在创面愈合后第 7 周 RT-PCR 检测 PGP 9.5 基因表达也与荧光密度结果相符,进一步说明了 NSCs 对创面神经的修复效果优于 BMSCs。另外血清对神经修复有一定的作用,至于具体通过什么机制,还有待于研究。

综上所述,NSCs 移植到体内后可直接分化为神经组织,促进皮肤神经的生长,减轻创面感觉异常情况,提高患者生活质量。

参 考 文 献

- [1] Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats[J]. Transplant Proc, 2009, 41(5): 1797-1800.

干细胞研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000347

转染 CX3CR1 基因对小鼠骨髓间充质干细胞 向 Fractalkine 趋化能力的影响

郭晓书, 李法琦

(重庆医科大学附属第一医院老年科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究在 Transwell 共培养体系中, 转染 CX3CR1 基因对小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向趋化因子 Fractalkine(FKN)趋化能力的影响。**方法:**采用差速贴壁法分离纯化小鼠 MSCs, 体外培养、传代扩增, 流式细胞术检测细胞表面抗原标志和细胞周期; 将携带有趋化因子受体 CX3CR1 基因及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的慢病毒(LV-CX3CR1-EGFP)及空载体慢病毒(LV-CON-EGFP)转染小鼠 MSCs 细胞, RT-PCR 法分别检测空白对照组、实验组、阴性对照组细胞中 CX3CR1 mRNA 表达情况, Western blot 印记法检测 CX3CR1 蛋白的表达水平, 并通过 Transwell 共培养体系观察不同转染组细胞向趋化因子 FKN 的迁移情况。**结果:**成功获得了细胞形态均一, 生长状态良好的 MSCs; 细胞 CD29、CD44、CD34 有阳性表达; 阴性对照组和空白对照组小鼠 MSCs 不表达 CX3CR1 基因; 构建的慢病毒过表达载体 pUbi-MSC-CX3CR1-EGFP 能成功转染至小鼠 MSCs 中, 并使转染后的 MSCs 表达 CX3CR1 mRNA 及蛋白。在 Transwell 共培养体系中, 转染 CX3CR1 基因的小鼠 MSCs 向趋化因子 FKN 趋化能力明显强于各对照组($P=0.000$), 其中阴性对照组浸润至下室的细胞数为: (13.80 ± 2.17) 个每高倍镜视野($n=5$)。实验组浸润至下室的细胞数为: (35.80 ± 3.34) 个每高倍镜视野($n=5$)。FKN 抗体阻断组浸润至下室的细胞数为 (14.80 ± 1.92) 个每高倍镜视野($n=5$)。**结论:**转染 CX3CR1 基因能有效增加小鼠 MSCs 向趋化因子 FKN 趋化的能力。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 趋化因子 Fractalkine; 趋化因子受体 CX3CR1; 慢病毒载体; 基因转染; 细胞迁移

【中图分类号】Q872

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-02-24

作者介绍: 郭晓书, Email: 422862919@qq.com,

研究方向: 老年医学心血管疾病方向。

通信作者: 李法琦, Email: faqili_2006@yahoo.com.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000347.html>

- [2] Brohlin M, Mahay D, Novikov LN, et al. Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells[J]. *Neurosci Res*, 2009, 64(1): 41-44.
- [3] 柯昌能, 郭小宝, 唐世杰. 真皮多能干细胞对皮肤创面神经修复的影响[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(12): 1931-1933.
- [4] Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2199-2204.
- [5] Kokaia Z, Lindvall O. Stem cell repair of striatal ischemia[J]. *Prog Brain Res*, 2012(201): 35-53.
- [6] 浦晓妹, 果磊, 汪正燕, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养鉴定以及向神经干细胞分化的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(3): 235-238.
- [7] Ziavara D, Makri G, Giompres P, et al. Neural stem cells transplanted in a mouse model of Parkinson's disease differentiate to neuronal phenotypes and reduce rotational deficit[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(7): 829-835.
- [8] Gincberg G, Arien-Zakay H, Lazarovici P, et al. Neural stem cells: therapeutic potential for neurodegenerative diseases[J]. *Br Med Bull*,

2012(104): 7-19.

- [9] Lu P, Wang Y, Graham L, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury[J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1264-1273.
- [10] Volarevic V, Erceg S, Bhattacharya SS, et al. Stem cell based therapy for spinal cord injury[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(8): 1309-1323.
- [11] Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, et al. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from IPS/ES cells[J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(4): 668-676.
- [12] Andres RH, Choi R, Steinberg GK, et al. Potential of adult neural stem cells in stroke therapy[J]. *Regen Med*, 2008, 3(6): 893-905.
- [13] 金澎, 徐如祥, 姜晓丹. 成人骨髓源性神经干细胞的致瘤性研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(1): 10-15.
- [14] 王岩峰, 吕刚, 赵宇. 神经干细胞移植促进脊髓损伤后脑源性神经营养因子的表达[J]. *中国骨伤*, 2008, 21(11): 836-838.
- [15] Carletti B, Piemonte F, Rossi F. Neuroprotection: the emerging concept of restorative neural stem cell biology for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2011, 9(2): 313-317.

(责任编辑: 冉明会)