

补阳还五汤对骨髓间质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的影响

张国福¹, 王和鸣²

(1. 惠州市中医医院骨科, 广东 惠州 516006 2 福建中医学院)

【摘要】 目的: 观察补阳还五汤联合骨髓间质干细胞 (MSCs) 移植对大鼠脊髓损伤后神经功能恢复以及移植的 MSCs 迁移情况的影响, 并探讨其作用机制。方法: SD 大鼠 80 只, 其中 70 只用改良 Allen 法制备大鼠 T₁₀ 脊髓损伤模型, 并随机分为中药 + MSCs 组 20 只、MSCs 组 20 只、假手术组 (无脊髓损伤) 10 只、中药组 20 只、空白对照组 (无治疗) 10 只。中药 + MSCs 组、MSCs 组、假手术组行大鼠尾静脉移植带 Brdu 标记的 MSCs。各组大鼠于术后 1、3、5 周观察神经功能恢复、免疫组化检测带标记的 MSCs 迁移情况。结果: 与空白对照组相比, 治疗组神经功能测定在术后 1、3、5 周时均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。术后 1 周移植组的脊髓组织内即可见 Brdu 标记阳性细胞 (假手术组除外), 术后 5 周中药 + MSCs 组 Brdu 阳性细胞计数较 MSCs 组有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论: 静脉注射移植的 MSCs 能够迁移到脊髓损伤组织, 并促进神经功能的恢复。补阳还五汤能促进移植的 MSCs 迁移, 同时有利于脊髓功能的恢复。

【关键词】 脊髓损伤; 骨髓间质干细胞; 静脉移植; 补阳还五汤

Effect of Buyang-Huanwu decoction (补阳还五汤) for treatment of spinal cord injury by mesenchymal stem cells transplantation in rats ZHANG Guofu*, WANG Heming* Department of Orthopaedics Huizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huizhou 516006 Guangdong, China

ABSTRACT Objective To investigate the effect and mechanism of Buyang-Huanwu decoction and mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation on neural functional recovery after spinal cord injury in rats and observe migration of the implanted Brdu marked MSCs. **Methods** Among 80 rats the spinal cord injured model of 70 rats was established by the modified Allen's method to damage the 10th thoracic vertebra of animal. Eighty rats were used and randomly divided into five groups: ① Combination therapy with Buyang-Huanwu decoction and MSCs transplantation group (20 rats); ② MSCs transplantation group (20 rats); ③ Sham group (no spinal cord injury) (10 rats); ④ Buyang-Huanwu decoction group (20 rats); ⑤ Blank control group (no treatment) (10 rats). The animals of group ①, ②, ③ that received MSCs transplantation were marked by intravenous injection of animal's tail. At the follow time of 1, 3, 5 weeks, the neural functional recovery of the animals were observed. The specimens of injured spinal segment were obtained for the detection of MSCs migration using immunohistochemical methods. **Results** In therapeutical groups, the neural functional recovery were improved significantly compared with the blank control group at 1, 3, 5 weeks ($P < 0.01$). The implanted Brdu positive MSCs migrated to the injured tissue of spinal cord at 1 week (except the sham group). Brdu marked cells of group ① were more than the MSCs transplantation group at 5 weeks ($P < 0.05$). **Conclusion** The transplanted MSCs may migrate to the injured tissue of spinal cord. After transplantation of MSCs spinal cord injury may improve the neural functional recovery. After spinal cord injury and administration with Buyang-Huanwu decoction, it is observed that the implanted MSCs migration in the spinal cord injury body of rats were promoted and the function of spinal cord were recovered.

Key words Spinal cord injuries; Mesenchymal stem cells; Vein transplantation; Buyang-Huanwu decoction

通讯作者: 张国福 (现调入江西中医学院附属医院脊柱外科, 江西南昌 330006)

过去人们认为, 脊髓等中枢神经损伤后, 神经细胞不能再生。近年来研究发现, 骨髓中多潜能的骨髓间质干细

胞(MSCs)可分化为神经细胞。因MSCs来源丰富,取材简便,易分离培养,已成为细胞替代治疗的理想选择。国外研究发现^[1,2],MSCs能局部和静脉注射移植治疗中枢神经系统损伤。如果通过静脉途径移植细胞,可到达相应的靶点,能避免局部移植的诸多不便及损伤的可能性。为明确静脉注射MSCs的可行性和治疗作用,我们进行本实验研究。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 80只 9~10周健康清洁级成年SD大鼠,由中科院上海实验动物中心福建代理处提供,体质量200g左右,雌雄不限。

1.2 动物造模与分组 70只大鼠采用改良Allen造模法,以质量10g的砝码自由坠落12.5cm打击T₁₀脊髓(致伤量125g·cm),造成T₁₀段脊髓的冲击伤。10只大鼠假手术造模:大鼠只暴露T₁₀段脊髓,而不打击该段脊髓。将造模成功的大鼠,按组间比较完全随机化(抽签)分组:中药+MSCs组20只、MSCs组20只、假手术组10只、中药组20只、空白对照组10只。

1.3 中药的制备 采用补阳还五汤,药物按照《中华人民共和国药典》规定剂量范围内的临床常用剂量称取组成,药物具体如下:生黄芪60g,当归10g,地龙10g,赤芍10g,川芎10g,桃仁10g,红花10g,将药物置于砂锅容器中,加入相当于药材体积5倍的纯净自来水浸泡1~2h,煮沸30min,过滤药液;再加入3倍量的纯净自来水继续煮沸20min,过滤,合并2次滤液,将药液浓缩至总量200ml备用,相当于临床等效药物浓度0.6g/ml。

1.4 MSCs的制备 取6周龄SD大鼠双下肢股、胫骨的骨髓,分离单核细胞,接种于塑料培养瓶中,置于37℃、5%CO₂培养箱培养,3d后弃去未贴壁细胞,前期研究经流式细胞术检测贴壁细胞表面标志,证实贴壁细胞为MSCs,将MSCs培养扩增至第3代,用第3代的MSCs移植。移植时PBS洗涤3次,1~2ml 0.25%胰蛋白酶消化细胞,短时低速离心3次(800~1000r/min,3~5min),去除悬液中的细胞碎片,用PBS重新悬浮细胞,并调至细胞终浓度1×10⁶/ml备用。

1.5 实验用药 中药按剂量每天25g/kg,上、下午2次灌胃,自动物麻醉苏醒后连续服药。MSCs移植(包括假手术组)在造模成功后第3天执行,将扩增至第3代带标记的MSCs麻醉下自大鼠尾静脉缓慢注射移植,移植细胞数量1×10⁶,移植的细胞悬液量1ml,空白对照组不做任何治疗。

1.6 神经功能评价 采用改良Tarlov评分和斜板试验。改良Tarlov评分:没有自主性运动,仅限于髌、膝关节的非反射性运动(0和1分);肢体髌、膝、踝3个主要关节的运动(2分);能主动支持体重和不协调步态或偶尔出现协调步态(3分);前肢和后肢协调的步态,行走时有趾间关节的运动(4分);正常步态(5分)。斜板试验:在一长方形木制板上垫2mm厚的橡胶垫,将大鼠头向前,身体纵轴与斜面板纵轴垂直放置,逐渐增大木板与水平面的角度,直至大鼠在原定位置上刚好可以维持5s这一角度即为倾斜平面临界角度。各组大鼠于造模完成后1、3、5周时检测。

1.7 组织标本的获取和制备 分别于造模完成后1、3周时,每组随机抽取大鼠2只,切取T₁₀脊髓标本,5周后将所有剩余动物处死,取其T₁₀脊髓组织标本,置于10%中性甲醛中固定,并脱水、石蜡包埋。

1.8 免疫组化分析 取中药+MSCs组、MSCs组、假手术组于移植造模完成后1、3、5周的脊髓组织蜡块,连续冠状切片,厚度为3μm,按免疫组化SP三步法检测,光镜下观察BrdU阳性标记细胞。各移植组均取术后5周6个样本,显微镜下每个样本随机记数10个非重叠视野(×400)中的BrdU阳性细胞数,计算平均值,将其平均值统计分析。

1.9 统计学分析 神经功能评分、免疫组化中的细胞计数以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并采用Excel软件及SPSS10.0软件,行单因素方差分析F检验。

2 结果

2.1 神经功能评价结果(见表1、2)

表1 各组大鼠损伤后行为学Tarbv评分结果($\bar{x} \pm s$ 分)

Tab 1 Tarbv scores of behavioral after injuries of rats ($\bar{x} \pm s$ score)

Groups	Tarbv scores		
	1 week	3 weeks	5 weeks
Drugs+MSCs	1.96±0.68 [*]	3.39±0.689 ^{*△}	4.13±0.619 ^{△△}
MSCs	1.50±0.607 [*]	2.56±0.616 [*]	3.25±0.577 [*]
Buyang Huanwu	1.60±0.598 [*]	1.89±0.676 [*]	2.63±0.619 [*]
Blank control	0.10±0.316	0.13±0.354	0.17±0.408

注:与MSCs组比较,△P<0.05,△△P<0.01;与空白对照组比较,*P<0.01

Note As compared with MSCs group △P<0.05, △△P<0.01; As compared with blank control group *P<0.01

表2 各组大鼠损伤后斜板试验结果($\bar{x} \pm s$ °)

Tab 2 Experimental result of incline after injuries of rats ($\bar{x} \pm s$ °)

Groups	Angle of incline		
	1 week	3 weeks	5 weeks
Drugs+MSCs	32.25±5.399 [*]	37.17±3.839 [*]	41.50±5.762 [△]
MSCs	30.70±3.840 [*]	34.22±3.264 [*]	33.81±5.406 [*]
Buyang Huanwu	29.55±3.927 [*]	32.22±4.181 [*]	32.25±5.508 [*]
Blank control	21.90±2.234	20.50±3.071	20.00±4.050

注:与MSCs组比较,△P<0.05与空白对照组比较*P<0.01

Note As compared with MSCs group △P<0.05; As compared with blank control group *P<0.01

从表1、2看,移植后1、3、5周各治疗组与空白对照组比较,均有显著性差异(P<0.01),说明运用中药、MSCs移植的方法,均对大鼠脊髓损伤有治疗作用。移植后3、5周,中药+MSCs组与单纯MSCs组比较有显著性差异(P<0.05),说明中药有加强MSCs移植对大鼠脊髓损伤的治疗作用。

2.2 免疫组化结果 假手术组脊髓组织中未见BrdU标记阳性细胞;其他MSCs移植治疗组可见细胞核呈棕黄色的BrdU阳性的MSCs存活于脊髓损伤区及周围;移植后1周

MSCs 迁移成活较多,移植后 3~5 周损伤处脊髓中仍有 MSCs 存活。移植后 5 周,各 MSCs 移植组阳性细胞计数统计结果:中药 + MSCs 组为 (9.86 ± 0.25) 个, MSCs 组为 (8.65 ± 0.95) 个,两组比较有显著性差异 ($F = 6.68, P < 0.05$),说明中药有促进移植的 MSCs 在宿主体内向脊髓损伤组织迁移作用。

3 讨论

3.1 骨髓间质干细胞的迁移 成年的动物(包括人)都有新的神经细胞形成和迁移,在治疗一些神经系统疾病时,如果需要进行移植细胞治疗时,在不能直接把需移植的细胞放到所需要的部位时,移植细胞就必须能够通过迁移到达损伤部位。本研究采用大鼠尾静脉注射移植 MSCs 的方法,结果表明移植的 MSCs 在宿主体内能够发生迁移。但在本实验研究中,假手术组脊髓组织内,未能检测到 MSCs 这可能与创伤部位炎症或修复等因素趋化作用有关。通过本实验可以得出:静脉注射移植的 MSCs 可以通过血液循环在宿主体内发生迁移;其迁移方向可能与创伤部位产生的趋化因子引导有关。

3.2 骨髓间质干细胞治疗作用机制 MSCs 移植对神经系统损伤的治疗作用,在不同的实验研究中均得到了证实。其作用机制是多方面的,首先, MSCs 移植后向病变部位的组织渗透融合、替代或补充损伤神经细胞,从而达到恢复神经功能的作用^[3];其次, MSCs 同宿主神经组织间的相互作用,可导致一些细胞因子和营养因子的产生^[4],从而改善损伤局部微环境,对神经功能的恢复发挥积极的作用。本实验研究结果表明,静脉注射移植 MSCs 对脊髓损伤后的大鼠神经功能恢复有治疗作用。在脊髓损伤组织内,可检测到移植的 MSCs 说明移植的 MSCs 有替代或补充损伤神经细胞的作用。至于移植的 MSCs 替代或补充损伤神经细胞后,具体是如何发挥作用,还有待进一步研究。

3.3 补阳还五汤治疗作用 补阳还五汤为清代医家王清任

所创,始载于《医林改错》,该方具有补气活血、通经活络的功效,主治半身不遂、口眼歪斜、手足麻木等症。现代临床常用于中风后遗症、小儿麻痹后遗症以及其他原因引起的偏瘫、截瘫或上、下肢痿软属气虚血瘀者。现代药理研究证明^[5]补阳还五汤具有以下作用:①扩张脑血管,增加脑的血流量,改善脑的血液循环;②改善损伤局部微循环;③抑制血小板聚集,改善血液流变性,降低血液黏滞性;④溶解血栓和预防血栓再发生,降低血脂;⑤对抗和改善脑缺氧。本实验研究结果显示:补阳还五汤治疗组的大鼠神经功能有所恢复,其治疗作用机制是通过补气活血、通经活络,扩张局部血管,增加血流量,减少脊髓损伤后血栓的形成,从而减轻了脊髓神经组织的缺血、缺氧,改善脊髓损伤处微循环。移植后 5 周免疫组化检测,中药 + MSCs 移植组阳性细胞数较 MSCs 移植组明显增多,说明中药有促进移植的 MSCs 在宿主体内向脊髓损伤组织迁移作用。

参考文献

- 1 Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al Spinal cord injury in rat Treatment with bone marrow stromal cell transplantation Neuroreport 2000; 11 (13): 3001.
- 2 Chen J, Li Y, Wang L, et al Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats Stroke 2001; 32(4): 1005-1011.
- 3 Mahmood A, Lu D, Li Y, et al Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats J Neurosurg 2001; 4: 589-595.
- 4 Chen X, Katakowski M, Li Y, et al Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts growth factor production J Neurosci Res 2002; 69(5): 687-691.
- 5 胡晓梅, 何洪阳, 郑重, 等. 加味补阳还五汤对实验性损伤脊髓轴浆运输的保护作用. 成都中医药大学学报, 2001, 24(1): 43-44.

(收稿日期: 2006-02-06 本文编辑: 李为农)

中国中医科学院望京医院骨伤科、风湿科进修招生通知

中国中医科学院望京医院(中国中医科学院骨伤科研究所)为国家中医药管理局批准的“全国中医骨伤专科医疗中心”、“全国重点骨伤学科”单位。全院共有床位 500 余张,其中骨伤科床位近 300 张。骨伤科高级专业技术职称人员 40 余名,博士生导师 8 名,硕士生导师 15 名,具有雄厚的骨伤科临床、教学与科研能力,是全国中医骨伤科医师培训基地。开设创伤、脊柱、骨关节、关节镜及推拿等专科,在颈椎病、腰椎间盘突出症、骨关节病、创伤骨折、外翻等专病方面的治疗独具特色,部分专病的治疗在国内居领先水平,在国际上享有盛誉。每周三安排知名专家授课,为中、西医骨科医师培训提供充裕的理论学习与临床实践的机会。

风湿免疫科为国家中医药管理局风湿病重点专病建设单位,具有较深厚的风湿病研究基础及先进的研究设施,治疗风湿类疾病有独特疗效。

我院每年 3、9 月招收两期进修生(要求具有执业医师资格),每期半年或 1 年(进修费 3 600 元/年)。欢迎全国各地中、西医医师来我院进修学习。

http://www.wjhospital.com.cn

地址:北京市朝阳区花家地街中国中医科学院望京医院医务处 邮编:100102 电话:010-64721263、010-64711199-4032, 传真:(010)64721263, 联系人:苏霞。

乘车路线:404、416、420、701、707、710、952 运通 101、107、201 路等到望京医院(花家地街)下车。

北京站:420 路公共汽车可直达;403 路至丽都饭店换 404 路到望京医院(花家地街)下车。

北京西客站:823 路公共汽车至东直门换 404 路到望京医院下车。