

· 基础研究 ·

人脐带来源 Muse 细胞培养、筛选、鉴定及其移植治疗大鼠脊髓损伤

冷子宽^{1,2}, 高正超¹, 贺西京¹, 赵英杰¹, 孙丽君¹, 翟静静¹, 许建中²

(1. 西安交通大学第二附属医院骨科, 陕西 西安 710004; 2. 郑州大学第一附属医院骨科, 河南 郑州 450052)

【摘要】 目的: 应用免疫磁珠筛选方法从人脐带华通胶间充质基质细胞中特异性地分选多系分化持续应激细胞 (multilineage-differentiating stress-enduring, Muse), 并探讨 Muse 细胞移植治疗大鼠亚急性脊髓损伤的安全性和有效性。方法: 将捐赠的脐带华通胶剥离剪碎、胶原酶/胰酶消化、密度梯度离心获得足量间充质基质细胞, 应用免疫磁珠特异性筛选 SSEA3+ 的 Muse 细胞, 并使用流式细胞仪及细胞免疫组织化学方法鉴定。体内实验: 使用 NYU-III 代大鼠脊髓损伤打击仪建立垂直打击脊髓损伤模型, 分为 A 组 (假手术组)、B 组 (对照组)、C 组 (Non-Muse 细胞移植组) 和 D 组 (Muse 细胞移植组)。A 组大鼠接受标准化的椎板切除手术, 但不进行脊髓打击; B、C、D 组大鼠均接受标准化的脊髓打击损伤, 10 g 撞击杆于 12.5 mm 高度自由落下。脊髓损伤造模后 2 周进行细胞移植, A 组大鼠仅打开伤口不接受移植操作, B、C、D 组大鼠分别接受 PBS 注射、Non-Muse 细胞移植、Muse 细胞移植, 每只大鼠脊髓接受四点注射法, 共 4×10^5 个细胞。自脊髓损伤造模术后 1 d 及 1、2、3、4、5、6 周分别进行大鼠 BBB 运动功能评分, 造模术后 6 周 (即细胞移植后 4 周) 处死动物, 用免疫荧光染色研究大鼠脊髓内移植细胞存活、迁移和分化情况。结果: 流式细胞仪显示脐带间充质基质细胞 CD105+、CD90+ 和 CD73+ 的百分比均达到 99.5% 以上, 且 CD45、CD14 表达均低于 0.5%, 而 SSEA3 阳性率仅有 1.46%。MACS 特异性筛选后的细胞群有 92.0% 同时表达 SSEA3 和 CD105, 且免疫组织化学显示 SSEA3 呈典型的膜染色、形态特别。动物实验: A 组动物在各个时间点的 BBB 评分均为 21。单因素方差分析及 LSD 检验 BBB 评分情况: 细胞移植后 6 周, C、D 组与 B 组比较差异均有统计学意义 ($P=0.004, 0.002$), C 组和 D 组比较差异无统计学意义。进一步组内配对 *t* 检验表明, C 组第 4 周与第 3 周比较差异有统计学意义 ($P=0.005$); D 组第 4 周与第 3 周比较差异有统计学意义 ($P=0.016$), 且第 6 周与第 5 周比较差异有统计学意义 ($P=0.034$), 说明大鼠运动功能持续改善。脊髓免疫组织化学染色显示, Muse 细胞和 Non-Muse 细胞均由注射点向损伤区迁移, 但 Muse 细胞存活数量明显多于 Non-Muse 细胞, 且在损伤区均匀分布。结论: 特异性免疫磁珠筛选是获得高纯度 Muse 细胞的良好高效的方法, Muse 细胞可在大鼠损伤脊髓内大量存活 4 周并向损伤区迁移, 且能持续改善大鼠运动功能, Muse 细胞有望成为治疗脊髓损伤的一种新的种子细胞。

【关键词】 脐带; 细胞培养技术; 细胞移植; 脊髓损伤

中图分类号: R681.5

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2019.04.007

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Cultivation, screening, identification and transplantation of Muse cell from human umbilical cord-derived for spinal cord injury in rats LENG Zi-kuan, GAO Zheng-chao, HE Xi-jing*, ZHAO Ying-jie, SUN Li-jun, ZHAI Jing-jing, and XU Jian-zhong. * Department of Orthopaedics, the Second of Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective: To investigate multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) by immunomagnetic bead screening from Wharton's jelly mesenchymal stromal cells (WJ-MSCs), and explore transplantation of Muse cell for safety and effectiveness of sub acute cord injury in rats. **Methods:** Donated Wharton's Jelly-mesenchymal stromal cells (WJ-MSCs) were successfully derived from a human umbilical cord by a series of procedures namely physical isolation of Wharton's Jelly from cord membrane, collagenase and trypsin treatment and density gradient centrifugation. Magnetic activated cell sorting was performed to specifically select SSEA3+ Muse cells, and flow cytometry and immunocytochemistry were used to identify further. In vivo, spinal cord contusion injury model in rats was induced by NYU-III impactor, and were randomly divided and equally into four groups, namely group A (sham), group B (control), group C (Non-Muse cells transplantation) and group D (Muse

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81571209)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 81571209)

通讯作者: 贺西京 E-mail: xijing_h@vip.tom.com

Corresponding author: HE Xi-jing E-mail: xijing_h@vip.tom.com

cells transplantation). Laminectomy was conducted in group A but no spinal cord contusion injury. Laminectomy and cord injury were performed in group B, C and D, 10 g trip rod was freely falling down from 12.5 mm. Two weeks later, group B, C and D were received PBS injection, Non-Muse cells transplantation and Muse cells transplantation respectively, four-point injection were performed in each cord with totally 4×10^5 cells. BBB scores were evaluated on 1 day, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 week after injury. Four weeks after cell transplantation, the rats were sacrificed, and immunohistochemistry were carried out to observe survival, migration and differentiation of the injected cells. **Result:** The expression of CD105, CD90 and CD73 were over 99.5% in the derived WJ-MSCs population, but CD45 and CD14 were lower than 0.5%, positive rate of SSEA3+ was 1.46% under flow cytometer, However, after MACS sorting, the percentage of 92.0% Muse cells expressed SSEA3 and CD105, and immunohistochemistry results of SSEA3 showed typically membrane morphology with special processes. In vivo, BBB scores was 21 in group A at different time points. One-way ANOVA and LSD analysis showed that BBB scores in group C and D were significantly higher than that in group B ($P=0.004, 0.002$), but there was no significantly difference between group C and D. Further intra-group paired *t* test showed that BBB score was significantly higher at 4 weeks than that 3 weeks in group C ($P=0.005$). However, in group D, BBB scores were significantly higher at 4 and 6 week than those at 3 and 5 weeks, *P* values were 0.005 and 0.016 respectively. Immunohistochemistry results showed that both Muse cells and Non-Muse cells could survive for 4 weeks in rats and they migrated from the four-point injection to injury site. But there showed more Muse cells survival than Non-Muse cells in the cord. **Conclusion:** Immunomagnetic bead screening is efficient to select large number of purified SSEA3+ Muse cells. Muse cells could survive and target-migrate in injured cord to improve BBB scores continuously. Muse cells are a novel kind of seed cells in the spinal cord injury treatment.

KEYWORDS Umbilical cord; Cell culture techniques; Cell transplantation; Spinal cord injuries

多系分化持续应激细胞 (multilineage-differentiating stress-enduring, Muse) 是一种特殊的成体多潜能干细胞^[1]。SSEA-3/CD105 双阳性是其细胞标志物。Muse 细胞是间充质基质细胞 (mesenchymal stromal cells, MSCs) 的 1 个亚群, 约占 0.01%~3%。Muse 细胞可以自我更新, 体外实验可以自发向内胚层、中胚层和外胚层三系细胞分化^[2]; 体内实验证实静脉注射移植的 Muse 干细胞可以自主归巢、迁移至机体损伤组织处, 并根据局部损伤细胞种类和微环境定向分化为组织修复细胞而整合入组织中^[1,3]。Muse 细胞已经在多种动物疾病中证实是安全有效的^[1,4-6]。目前关于 Muse 细胞的文献报道较少。所以, Muse 细胞作为一种新发现的、初步被证实具有组织修复功能的理想种子细胞, 有待于进一步深入研究。本研究首次从人脐带华通胶 (Wharton's jelly, WJ) 中分离、培养、免疫磁珠筛选 Muse 细胞, 并初步验证其移植治疗大鼠亚急性脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 的安全性和有效性, 为干细胞移植治疗脊髓损伤神经修复提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料、动物及分组

健康孕妇签署知情同意后自愿捐赠脐带, 用于分离、培养脐带华通胶间充质基质细胞 (WJ-MSCs)。20 只 SPF 级 (77±7) d 雄性 SD 大鼠, 体重 200~250 g, 随机分为 4 组, 分别为 A 组 (假手术组, Sham), B 组 (对照组, SCI+PBS 注射组), C 组 (SCI+Non-Muse 细胞移植组), D 组 (SCI+ Muse 细胞移植组), 每组 5 只。

1.2 主要仪器与试剂

NYU-III 代脊髓损伤打击仪 (硬件型号 M-II-1042, 配套软件 Impactor 1.32.6, 美国罗格斯大学生产), 荧光显微镜 (Zeiss Axiovert 200 M), 相差显微镜 (Zeiss Axio Observer A1), 激光共聚焦显微镜 (Zeiss LSM510), CO₂ 孵育箱 (RC03000T-9-ABC, Kendro Laboratory), 流式细胞仪 (MACSQuant Analyzer 10, Miltenyi Biotec), 小型免疫磁珠分选器 (130-042-102, Miltenyi Biotec), MS 免疫磁珠分选柱子 (130042201, Miltenyi Biotec), 冷冻切片机 (Hacker Bright OTF 5000 LS4, 美国)。实验所用抗体: 大鼠抗人 SSEA3 (MA1-020, Thermo Fisher), IgMκ 同型对照抗体 (550342, BD Pharmingen), 兔抗人 CD105 (PA5-12511, Thermo Fisher, 用于免疫组织化学), 二抗山羊抗大鼠 FITC-488 (112095075, Jackson ImmunoResearch), 二抗山羊抗兔 Alexa Fluor®555 (ab150086, Abcam), 抗大鼠 Kappa 磁珠 (130047401, Miltenyi Biotec), Stem 101 (Y40400, Takara Bio, Inc.), Hoechst 33342 (62249, Thermo Fisher)。用于流式细胞仪的抗体均购于美国 Miltenyi Biotec 公司: CD105-APC (130094926), CD73-PE-Vio770 (130104192), CD90-APC (130095402), CD45-VioBlue (130092880), CD14 (130098070), 同时购买对应的同型对照抗体。其他: I 型胶原酶 (17100-017, Gibco), 胰蛋白酶 (15090, Gibco)。

1.3 实验方法

1.3.1 脐带 WJ-MSCs 分离、培养、鉴定 参考已有研究^[7]中人脐带华通胶间充质基质细胞 (WJ-MSCs)

提取方法,去除脐带 2 根动脉和 1 根静脉后,将华通胶从脐带外膜刮下,用剪刀剪碎华通胶间充质组织, I 型胶原酶消化过夜。第 2 天,离心废弃上清液后,再加入胰蛋白酶,进一步消化分离细胞后,过滤去除较大组织块获得细胞悬液,进一步密度梯度离心方法去除悬液中的红细胞,置于 10 cm 培养皿中贴壁培养,原代细胞标记为 P0。每 3 d 换培养液 1 次,保持培养皿静置 2~3 周。当细胞融合率达到 80% 时进行细胞传代,流式细胞术对第 3 代细胞(即 WJ-MSCs P2)细胞表面标志物进行鉴定。依据国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)制定的标准^[8]评估 WJ-MSCs P2 细胞纯度及 SSEA3+ 细胞百分比。

1.3.2 免疫磁珠特异性筛选 SSEA3+ Muse 细胞

采用免疫磁珠筛选(magnetic activated cell sorting, MACS)方法从 WJ-MSCs P2 中分选 SSEA3+ 的 Muse 细胞:收集含有不超过 6×10^6 个细胞的 200 μl 悬液,按 1:20 体积比加入 SSEA3 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 1 h;之后按照 20 μl 抗大鼠 Kappa 磁珠对应 80 μl 细胞悬液比例,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 15 min,MACS 缓冲液清洗 2 次后制备 1 ml 细胞悬液备用。将 MACS 缓冲液湿润后的 MS 分选柱子放入分选器中,加入制备好的细胞悬液,SSEA3 阳性的细胞(Muse)会通过物理磁场力吸附在分选柱子中,SSEA3 阴性细胞(Non-Muse)会直接流出分选柱子。收集柱子内的细胞,流式细胞术检测 SSEA3 以评估 MACS 分选效果。

1.3.3 大鼠 T₁₁ 脊髓节段 SCI 打击模型制备及 Muse 细胞移植 根据 Young^[9]建立的大鼠 T₁₁ 脊髓节段打击模型标准化制备方法,B、C、D 组大鼠脊髓均接受打击损伤,对假手术组大鼠仅打开椎板,不进行打击。2.5% 异氟烷气体面罩麻醉大鼠,消毒后依次切开皮肤、分离椎旁肌肉,依次咬除 T₁₀ 棘突、椎板和 T₉ 棘突、远端 1/2 椎板,修整骨窗近长方形。10 g 打击杆于 12.5 mm 高处自由落下,打击所暴露的脊髓中部(即 T₁₁ 脊髓节段)。术后予皮下注射头孢唑啉(50 mg/kg)1 周,每日上午给大鼠挤尿 1 次至其逐渐恢复自主排尿。以脊髓损伤造模时间点为基准,2 周后再次打开伤口进行局部注射移植。将 MACS 筛选的 Muse 细胞或 non-Muse 细胞悬液,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\mu\text{l}$ 。在损伤区外围的远端左侧、远端右侧、近端左侧和近端右侧 4 个点分别注射,注射方式为 0.4 μl -2 min-0.4 μl -2 min-0.2 μl -2 min,6 min 共移植 4×10^5 个细胞。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 评估大鼠运动功能情况 采用 BBB(Basso Beattie Bresnahan)评分法评估大鼠运动功能情

况^[10]。在脊髓损伤造模后 1 d 及 1、2、3、4、5、6 周时,由 2 位实验员同时评价 1 只大鼠运动功能,2 位实验员不知道大鼠分组情况(盲法),意见不一致时倾向于评分较低者。BBB 评分时保持环境安静,每只大鼠 4 min。

1.4.2 脊髓标本免疫荧光染色 脊髓损伤后 6 周(即细胞移植后 4 周)10% 水合氯醛过量麻醉大鼠,4% PFA 灌注后取出受损脊髓节段并置于 4% PFA 中,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 8 h 进行后固定,蔗糖梯度脱水,OCT 包埋剂中-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻。使用冷冻切片机冠状位切 20 μm 厚度组织切片。5% 山羊血清室温封闭 30 min,加入小鼠抗人 Stem 101(1:500)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。二抗使用山羊抗小鼠 Alexa Fluor[®] 555 conjugated dye(1:500,Thermo Fisher A-21422)室温下避光孵育 30 min。使用 Hoechst 33342(1:1 000)染细胞核。观察移植细胞的存活、迁移和分化情况。

1.5 统计学处理

使用 GraphPad Prism 7.04 做图。使用 IBM SPSS 23 分析数据,定量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用单因素方差分析和 LSD 检验分析脊髓损伤造模打击时脊髓压缩量、打击杆头接触脊髓表面时的速度和 大鼠 BBB 运动功能评分,使用配对 *t* 检验对组内 BBB 评分变化进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 WJ-MSCs 培养、鉴定及 SSEA3 表达情况

光学显微镜显示 WJ-MSCs 形态均匀,呈梭形或纺锤形(图 1a)。流式细胞仪观察结果显示细胞标志物表达情况:CD105+、CD90+、CD73+、CD14-、CD45- 细胞纯度达到 99.5%,完全符合 ISCT 标准;此时 Muse 细胞百分比仅为 1.46%(图 1)。

2.2 流式细胞术和免疫组织化学染色鉴定 MACS 筛选后的 Muse 细胞

免疫磁珠筛选术(MACS)后将收集的 MS 分选柱子里的细胞立即进行 SSEA3 染色,流式细胞仪检测显示 91.98% 细胞为 SSEA3+/CD105+ 双阳性,剩余 7.84% 是细胞碎片,说明经过 MACS 筛选后可以获得高纯度的 Muse 细胞。将筛选后的 Muse 细胞铺片于 24 孔板盖玻片,培养 2 d 后 4% PFA 固定,免疫组织化学染色显示细胞呈 SSEA3+/CD105+ 双阳性(图 2)。

2.3 大鼠脊髓损伤造模手术和细胞移植手术

SCI 手术顺利,手术骨窗呈长方形,长(6.4 ± 0.8) mm,宽(3.2 ± 0.1) mm。术中打击软件实时监测整个打击过程(图 3),打击杆质量为 10 g。单因素方差分析和 LSD 组间分析表明打击时脊髓压缩量和打

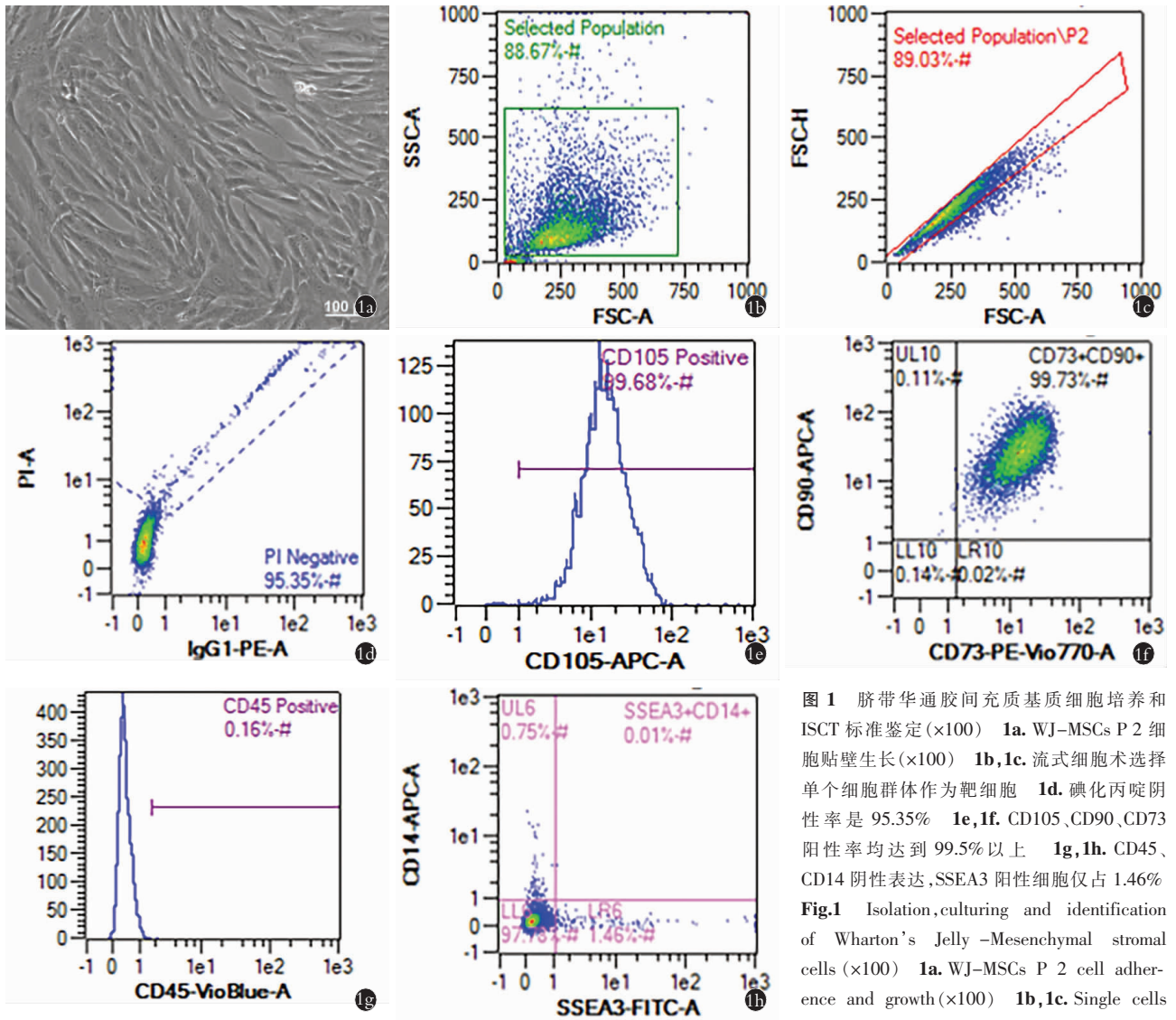


图 1 脐带华通胶间充质基质细胞培养和 ISCT 标准鉴定($\times 100$) 1a. WJ-MSCs P 2 细胞贴壁生长($\times 100$) 1b,1c. 流式细胞术选择单个细胞群体作为靶细胞 1d. 碘化丙啶阴性率是 95.35% 1e,1f. CD105、CD90、CD73 阳性率均达到 99.5% 以上 1g,1h. CD45、CD14 阴性表达,SSEA3 阳性细胞仅占 1.46% Fig.1 Isolation,culturing and identification of Wharton's Jelly -Mesenchymal stromal cells ($\times 100$) 1a. WJ-MSCs P 2 cell adherence and growth($\times 100$) 1b,1c. Single cells were gated population in flow cytometry

1d. Negative rate of propidium iodide was 95.35% 1e,1f. Positive expression of CD105,CD90 and CD73 were accounted for 99.5% 1g,1h. Negative expression of CD45 and CD14,and positive SSEA3 cells was accounted for 1.46%

击杆头接触脊髓表面时的速度各组之间差异无统计学意义 ($F=0.09, 1.42; P=0.964, 0.275$), 平均值分别是 (1.80 ± 0.07) mm 和 (0.49 ± 0.06) m/s, 表明打击杆撞击脊髓的能量组间差异无统计学意义, 脊髓损伤程度组间差异无统计学意义。

Keck Center NYU-III 打击器打击时大鼠后肢可出现抽搐现象, 所有大鼠于术后 0.5 h 内麻醉复苏, B、C、D 组大鼠苏醒后均表现为完全截瘫, 后肢及尾巴无活动, 对针刺刺激亦无反应。术后出现排尿障碍, 排便未见明显障碍。术后偶可见血尿, 经过及时人工排尿及抗生素注射, 血尿逐渐消失, 实验期间无明显感染迹象, 实验期间无动物死亡。

大鼠脊髓损伤后 2 周再次打开伤口, 使用咬骨钳咬除阻碍微量注射器进针的新骨并止血。细胞移植示意图和术中实况如图 4 所示, 采用四点注射法

将细胞悬液或 PBS 注射入脊髓后根内, 每点的细胞注射数量为 1×10^5 个。本实验中所用的注射方式没有发生注射细胞悬液外溢的情况, 细胞移植后不使用免疫抑制剂。

2.4 大鼠 BBB 运动功能评分

A 组在椎板打开术后各时间点 BBB 评分均为 21 分, 与术前一致, 说明椎板打开术不会对大鼠后肢运动功能产生影响。B、C、D 组在脊髓打击造模术后随着时间的增加, BBB 评分逐渐增加(表 1)。造模术后 1 d 及 1、2、3、4、5 周各时间点的 BBB 评分各组之间 LSD 分析差异无统计学意义, 而造模术后第 6 周(即细胞移植后第 4 周), C 组与 B 组比较差异有统计学意义 ($P=0.004$), D 组与 B 组差异有统计学意义 ($P=0.002$), 但 C 组和 D 组比较差异无统计学意义 ($P=0.626$)。表明细胞移植组在移植后第 4 周可以

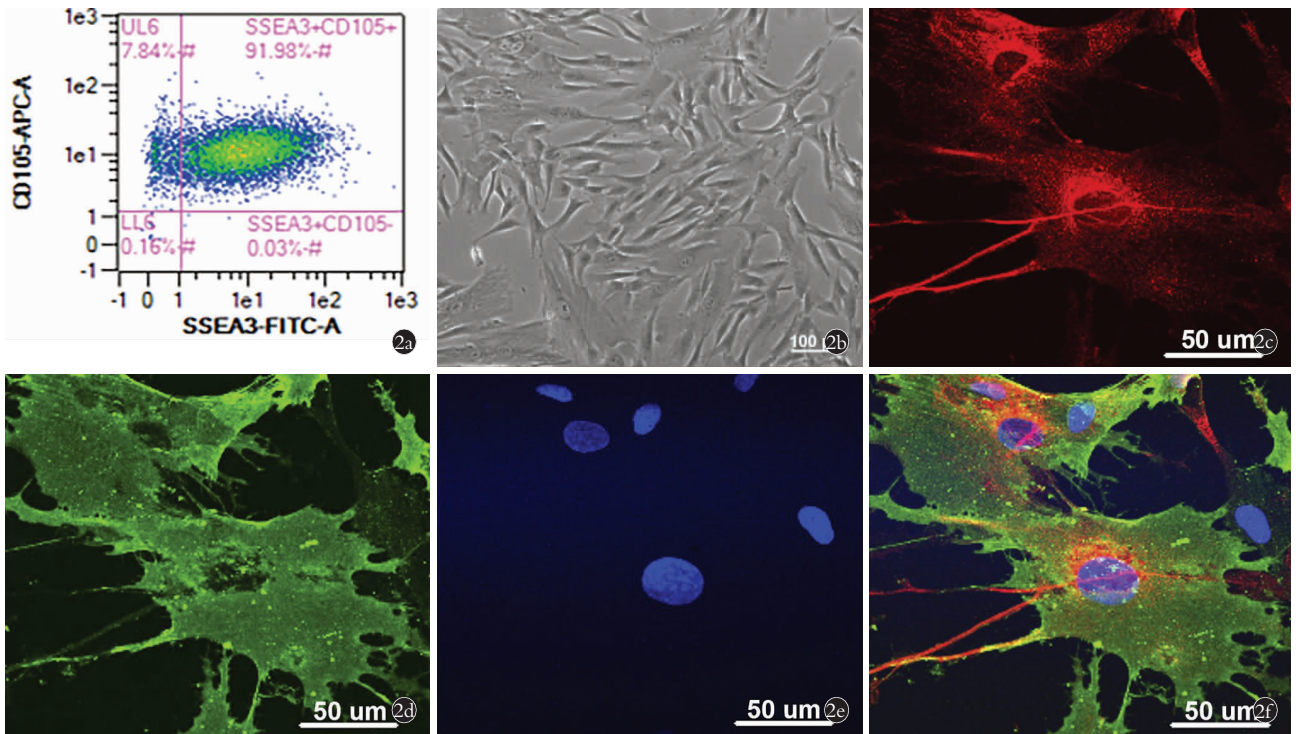


图 2 筛选后的 Muse 细胞 SSEA3/CD105 染色 (x400) 2a. 流式细胞仪鉴定筛选后 SSEA3+ 细胞占 92% 2b. Muse 细胞贴壁生长 (x100) 2c, 2d, 2e, 2f. 分别为 Muse 细胞 CD105、SSEA3、Hoechst 33342 染色和复合图像 (x400)

Fig.2 SSEA3 and CD105 staining of purified Muse cells (x400) 2a. SSEA3+ was accounted for 92% screened by flow cytometer 2b. Muse cell adherence and growth (x100) 2c, 2d, 2e, 2f. Staining and compound picture of CD105, SSEA3, Hoechst 33342 for Muse cells (x400)

表 1 术后各组不同时间点大鼠 BBB 运动功能评分比较 (x±s, 分)

Tab.1 Comparison of BBB scores among group B, C and D at different time points (x±s, score)

组别	鼠数(只)	术后 1 d	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周	术后 5 周	术后 6 周
对照组(B 组)	5	1.40±0.55	9.20±0.45	10.80±0.41	11.60±0.59	12.00±0.71	12.20±0.44	12.20±0.44
Non-Muse 细胞移植组(C 组)	5	1.20±0.45	9.40±1.14	10.60±0.55	11.20±0.48	12.60±0.54	13.00±0.70	13.60±0.55*
Muse 细胞移植组(D 组)	5	1.20±0.45	9.00±0.71	10.40±0.56	11.40±0.51	12.20±0.84	12.80±0.84	13.80±0.68*
F 值		0.286	0.300	0.750	0.692	0.933	1.857	9.500
P 值		0.756	0.746	0.493	0.465	0.420	0.198	0.003

注:与 B 组比较, *P=0.004, #P=0.002

Note: Compared with group B, *P=0.004, #P=0.002

明显改善大鼠运动功能, 而此时 Non-Muse 细胞移植组和 Muse 细胞移植组对大鼠运动功能的改善没有明显差异。进一步对 B、C、D 组的大鼠 BBB 评分进行组内配对 t 检验, 结果见表 2, 两组细胞移植后第 1 周与第 2 周之间 BBB 评分差异均无有统计学意义; C 组第 4 周与第 3 周比较差异有统计学意义 (P=0.005); D 组第 4 周与第 3 周比较差异有统计学意义 (P=0.016), 且第 6 周与第 5 周比较差异也有统计学意义 (P=0.034)。

2.5 Muse 细胞在大鼠脊髓内的存活、迁移和分化

应用人细胞核特异性抗体 Stem 101 对移植的人细胞的存活和迁移进行鉴定。细胞移植 4 周后, 冠

状位上, 脊髓损伤区呈椭圆形, 长轴约 2.5 mm, 短轴约 0.9 mm。B 组可见较大脊髓空洞; C 组脊髓空洞较小, 细胞注射点区域未见细胞红染, 损伤区域内可见少量人细胞核红染; D 组脊髓空洞较小, 细胞注射点区域未见细胞红染, 损伤区域内可见大量人细胞核红染, 且均匀分布在损伤区(图 5)。C 组和 D 组, 进一步免疫组织化学染色显示神经干细胞标志物 (Nestin)、胶质细胞标志物 (GFAP)、神经元标志物 (NeuN)、小胶质细胞标志物 (Iba-1)、CD14 均为阴性, 表明此时 Muse 细胞可能尚未向功能细胞分化。

3 讨论

Muse 细胞作为一种多潜能干细胞, 除了具有自

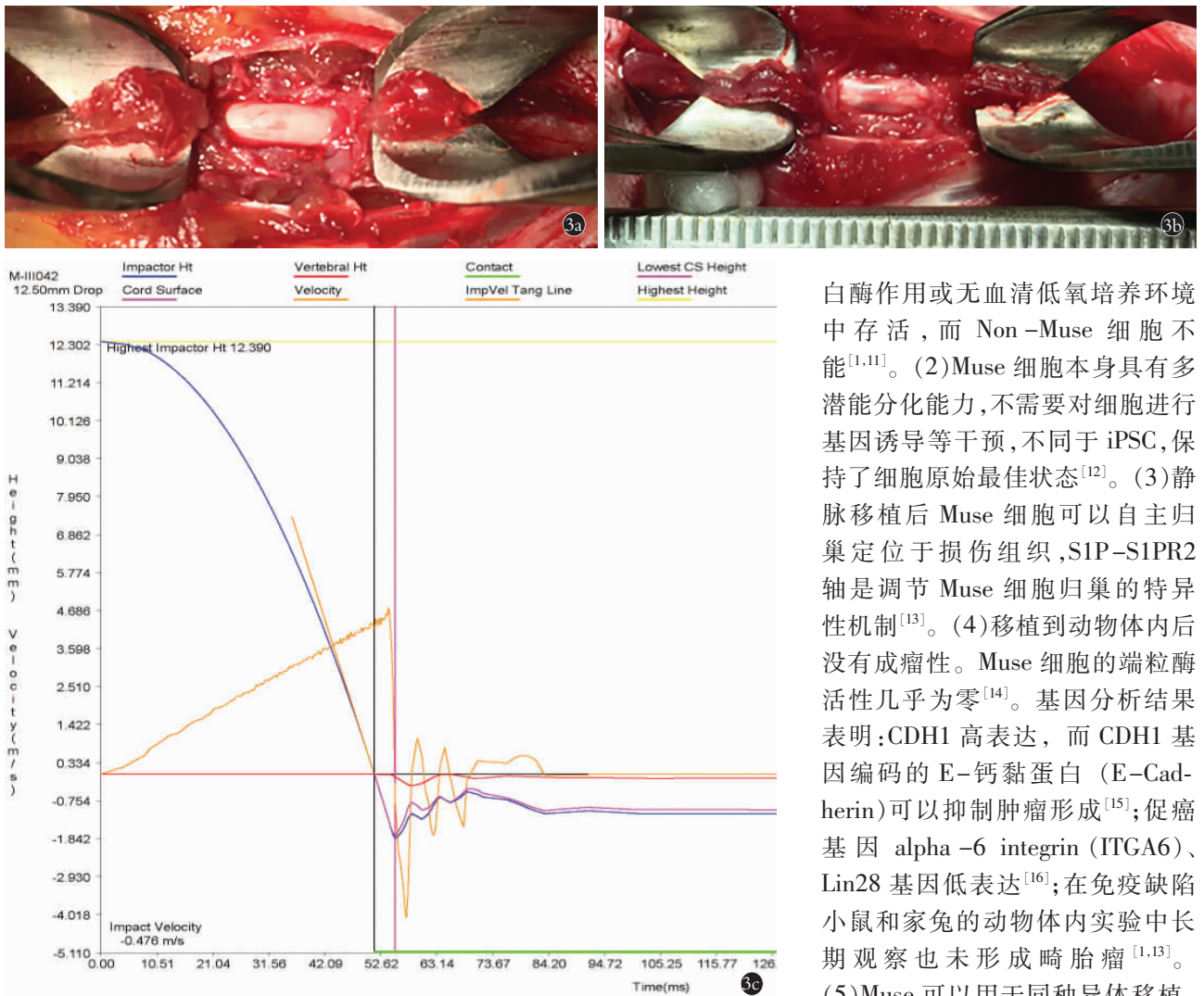


图 3 大鼠脊髓损伤造模(直视,图中标尺最小刻度是 1 mm) 3a.咬除大鼠 T₁₀ 椎板和 T₉ 远端 1/2 椎板后的脊髓打击窗口 3b.打击大鼠脊髓后局部充血、出血 3c.脊髓打击仪配套软件实时监测打击过程

Fig.3 Spinal cord contusion injury in rats (direct-vision, minimum scale was 1 mm in the image) 3a. Spinal hit window by biting away T₁₀ vertebral plate and T₉ distal 1/2 vertebral plate 3b. Local congestion and bleeding caused by hit spinal of rats 3c. Injury procedure recorded by spinal hit bundled software

我更新和向三系分化的能力外^[2],还具有 5 个特殊的性质:(1)能抵抗恶劣应激环境,这也是一种筛选 Muse 细胞的方法,如 Muse 细胞可以在长时间胰蛋

白酶作用或无血清低氧培养环境中存活,而 Non-Muse 细胞不能^[1,11]。(2)Muse 细胞本身具有多潜能分化能力,不需要对细胞进行基因诱导等干预,不同于 iPSC,保持了细胞原始最佳状态^[12]。(3)静脉移植后 Muse 细胞可以自主归巢定位于损伤组织,S1P-S1PR2 轴是调节 Muse 细胞归巢的特异性机制^[13]。(4)移植到动物体内后没有成瘤性。Muse 细胞的端粒酶活性几乎为零^[14]。基因分析结果表明:CDH1 高表达,而 CDH1 基因编码的 E-钙黏蛋白 (E-Cadherin)可以抑制肿瘤形成^[15];促癌基因 alpha-6 integrin (ITGA6)、Lin28 基因低表达^[16];在免疫缺陷小鼠和家兔的动物体内实验中中长期观察也未形成畸胎瘤^[1,13]。(5)Muse 可以用于同种异体移植,而不会被排斥。动物实验表明同种异体 Muse 细胞移植后,器官功能持续改善,大量细胞存活、归巢、分化为目标细胞并在宿主器官存活至少 6 个月,这为临床试验提供了基础和可能^[13]。总之,Muse 细胞的这 5 大特性让动物或临床实验

中的组织再生修复简化为 2 步:同种异体骨髓、脂肪或脐带等来源间充质细胞中筛选出 Muse 细胞;之后,在疾病的急性期或亚急性期静脉注射或局部注

表 2 各组不同时间点 BBB 评分比较的统计值
Tab.2 Statistical value among three groups at different time points

项目	对照组(B组)		Non-Muse 细胞移植组(C组)		Muse 细胞移植组(D组)	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
术后 2 周 vs 术后 3 周	-4.000	0.016	-2.449	0.070	-3.162	0.034
术后 3 周 vs 术后 4 周	-1.633	0.178	-5.715	0.005	-4.000	0.016
术后 4 周 vs 术后 5 周	-1.000	0.374	-1.633	0.178	-1.000	0.374
术后 5 周 vs 术后 6 周	无变化	无变化	-2.449	0.070	-3.162	0.034

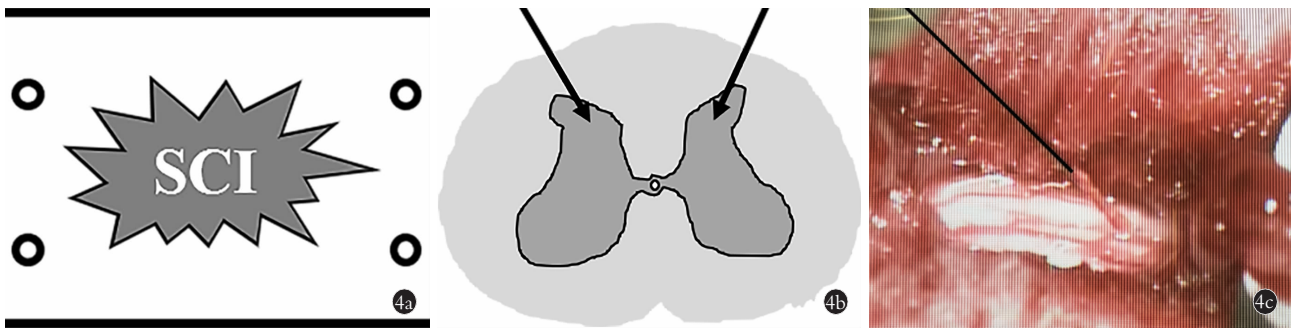


图 4 细胞移植示意图和实况图 (×10) 4a. 脊髓冠状位示四点注射法位置 4b. 细胞移植进针点横断面示意图, 将细胞打入脊髓灰质后角 4c. 细胞移植实况, 微量注射器针头 (黑线) 进入脊髓 (×10)

Fig.4 Sketch map and picture of cell transplantation (×10) 4a. The sketch map of the four injection points at coronal direction 4b. The sketch map of the four injection points at cross section showed cells were injected into posterior horn of spinal polio 4c. The operation of cell transplantation under the microscope, and the microsyringe was inserted into spinal cord (×10)

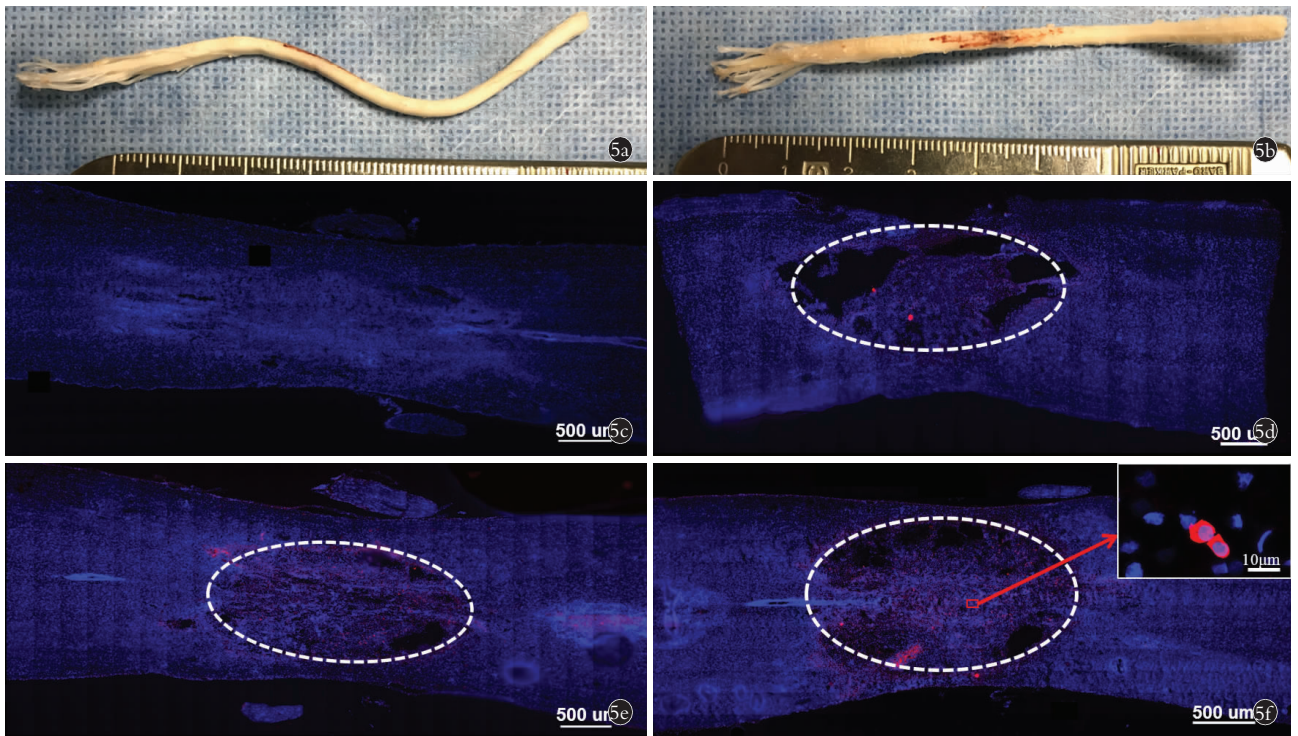


图 5 人细胞核特异性 Stem 101 和 Hoechst 33342 染色结果 (大体组合图片) 5a. 大体脊髓侧面观 5b. 大体脊髓正面观 5c. 假手术组 5d. PBS 注射组, 脊髓损伤区域组织较杂乱 5e. Non-Muse 细胞移植组, 少量存活的细胞从注射区迁移到损伤区 5f. Muse 细胞移植组, 大量存活的细胞从注射区迁移到损伤区, 右上角图是激光共聚焦观察 Muse 细胞存活 4 周的情况 (×400)

Fig.5 Stem 101 and Hoechst 33342 staining of spinal cords (merged images) 5a. Injured spinal cord of rat on lateral view 5b. Injured spinal cord of rat on anterior view 5c. Spinal cord of uninjured rat 5d. Spinal cord of PBS injected rats showed injured tissue was in disorder 5e. Spinal cord of Non-Muse cells transplanted rat showed a little survived cells transplanted from injection area to injured area 5f. Spinal cord of Muse cells transplanted rats showed a number of survived cells transplanted from injection area to injured area, and the right up image was survival of Muse cell under laser confocal microscopy at 4 weeks (×400)

射 (皮肤损伤修复等) 进行 Muse 细胞移植^[3]。

目前已经发现 Muse 细胞存在于骨髓、脂肪、皮肤、脾脏、胰腺、脐带等间充质组织, 而常用的筛选来源是骨髓间充质和脂肪间充质组织, 但 Muse 细胞含量仅有 0.01%~3%^[17]。目前常用的筛选方法是流式细胞仪筛选术 (fluorescence-activated cell sorting,

FACS)^[3], 但是 FACS 筛选后的细胞不能直接用于动物实验, 且筛选过程较昂贵。截止目前有两篇文献记录使用 MACS 从骨髓间充质细胞和脂肪间充质细胞中筛选 Muse 细胞, 但筛选的细胞 SSEA3+ 百分比仅有 77.1% 和 71.3%^[6]。本研究是首次从脐带间充质细胞中 MACS 筛选 Muse 细胞且 SSEA3+ 百分比达到

92.0%。本研究筛选中有 2 点经验值得借鉴:(1)MS 筛选柱子上样时不要超过 6×10^6 个细胞,且细胞悬液体积是 2 ml 而不是推荐的 0.5 ml,可以有效避免细胞堵塞在柱子内。(2)最后的洗脱步骤中,使用 2 ml 的 MACS 缓冲液而不是 1 ml,且推动活塞前等待 3 min,有利于 Muse 细胞从柱子内洗脱出来。

本实验中细胞移植后观察期为 4 周,Non-Muse 细胞移植组和 Muse 细胞移植组均观察到细胞存活且定向向损伤区域迁移,但是 Non-Muse 细胞移植组存活的细胞数量明显要少于 Muse 细胞移植组。进一步对对照组、Non-Muse 细胞移植组和 Muse 细胞移植组的大鼠 BBB 评分进行组内配对 *t* 检验,结果如表 2 所示,说明 Non-Muse 细胞移植组 BBB 评分改善主要是细胞移植后第 1~2 周内,源于 Non-Muse 细胞的早期免疫调节作用;而 Muse 细胞移植组 BBB 评分改善在移植后 1~2 周内和移植后 3~4 周内均有显著性改善,说明 Muse 细胞可以持续改善大鼠运动功能。细胞移植后更长期的观察值得进一步研究,根据研究文献和本实验中观察到的现象,可以推测 Non-Muse 细胞移植组的细胞将进一步凋亡。在非免疫缺陷大鼠研究中,更长期的观察期内需要应用免疫抑制剂,因为 Muse 细胞虽然可以抵抗恶劣的生长环境,但 Muse 细胞一旦分化为局部功能细胞,会因丢失了抵抗恶劣环境的能力而被免疫排斥。Muse 细胞分化为功能细胞的时间大概 4~5 周^[18],这也是本实验设计为在移植后 4 周处死动物的原因。更长期的观察实验建议使用免疫缺陷大鼠、观察 8~12 周。

参考文献

- [1] Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(19):8639-8643.
- [2] Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, et al. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells[J]. Nat Protoc, 2013, 8(7):1391-1415.
- [3] Dezawa M. Muse cells provide the pluripotency of mesenchymal stem cells; direct contribution of muse cells to tissue regeneration [J]. Cell Transplant, 2016, 25(5):849-861.
- [4] Uchida H, Morita T, Niizuma K, et al. Transplantation of unique subpopulation of fibroblasts, Muse cells, ameliorates experimental stroke possibly via robust neuronal differentiation[J]. Stem Cells, 2016, 34(1):160-173.
- [5] Katagiri H, Kushida Y, Nojima M, et al. A distinct subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells, Muse cells, directly commit to the replacement of liver components[J]. Am J Transplant, 2016, 16(2):468-483.
- [6] Uchida H, Niizuma K, Kushida Y, et al. Human Muse cells reconstruct neuronal circuitry in subacute lacunar stroke model[J]. Stroke, 2017, 48(2):428-435.
- [7] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. Stem Cells, 2004, 22(7):1330-1337.
- [8] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4):315-317.
- [9] Young W. Spinal cord contusion model[J]. Prog Brain Res, 2002, 137:231-255.
- [10] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection[J]. Exp Neurol, 1996, 139(2):244-256.
- [11] Gimeno ML, Fuertes F, Barcala Tabarozzi AE, et al. Pluripotent nontumorigenic adipose tissue-derived Muse cells have immunomodulatory capacity mediated by transforming growth factor- β 1[J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(1):161-173.
- [12] Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Muse cells and induced pluripotent stem cell: implication of the elite model[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(22):3739-3750.
- [13] Yamada Y, Wakao S, Kushida Y, et al. S1P-S1PR2 Axis mediates homing of Muse cells into damaged heart for long-lasting tissue repair and functional recovery after acute myocardial infarction[J]. Circ Res, 2018, 122(8):1069-1083.
- [14] Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, et al. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(7):717-728.
- [15] Ceteci F, Ceteci S, Karreman C, et al. Disruption of tumor cell adhesion promotes angiogenic switch and progression to micrometastasis in RAF-driven murine lung cancer[J]. Cancer Cell, 2007, 12(2):145-159.
- [16] Thornton JE, Gregory RI. How does Lin28 let-7 control development and disease[J]. Trends Cell Biol, 2012, 22(9):474-482.
- [17] Alessio N, Squillaro T, Ozcan S, et al. Stress and stem cells: adult Muse cells tolerate extensive genotoxic stimuli better than mesenchymal stromal cells[J]. Oncotarget, 2018, 9(27):19328-19341.
- [18] Uchida N, Kushida Y, Kitada M, et al. Beneficial effects of systemically administered human Muse cells in adriamycin nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(10):2946-2960.

(收稿日期:2019-03-12 本文编辑:连智华)