

## · 基础研究 ·

bFGF 与骨髓间充质干细胞联合应用对大鼠  
脊髓损伤的修复作用黄兴锐<sup>1</sup>, 徐浩<sup>1</sup>, 张晔<sup>2</sup>, 蒋元斌<sup>1</sup>, 夏春林<sup>2</sup>, 方姝晨<sup>1</sup>

(1. 吴江区中医医院 吴江区第二人民医院骨科, 江苏 苏州 215221; 2. 苏州大学医学部博习临床解剖学研究所暨细胞神经生物学研究室, 江苏 苏州 215123)

**【摘要】** 目的: 观察骨髓间充质干细胞(BMSCs)与成纤维细胞生长因子(bFGF)联合移植对大鼠脊髓损伤的修复作用, 并探讨其机制。方法: 利用血清培养技术获得 SD 大鼠 BMSCs。80 只健康雄性 6 周龄 SD 大鼠(重约 240 g)随机分为 4 组, 每组 20 只。假手术组行单纯椎板切除, 不损伤脊髓, 与其余 3 组同条件饲养。其余 3 组均采用左侧 T<sub>9</sub> 脊髓半切, 建立脊髓损伤模型。制模 9 d 后进行损伤局部移植治疗, 对照组损伤处植入吸附有生理盐水的明胶海绵; BMSCs 移植组损伤处植入吸附有 BMSCs 的明胶海绵; bFGF+BMSCs 移植组损伤处植入吸附有 bFGF+BMSCs 的明胶海绵。术后 4、8 周后 Western blotting 分析受损脊髓组织中 NF-200、GFAP 表达水平, Basso Beattie Bresnahan (BBB) 运动功能评分量表评价大鼠的后肢功能恢复情况。结果: 术后 4、8 周后 BMSCs 移植组和 bFGF+BMSCs 移植组的 (BBB) 评分较对照组改善 ( $P < 0.05$ ), 且 bFGF+BMSCs 移植组与 BMSCs 移植组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 术后 4、8 周后 NF200 在对照组表达极少, 在 BMSCs 移植组只有少量表达, 而 bFGF+BMSCs 移植组呈高表达 ( $P < 0.05$ )。GFAP 在对照组表达高, BMSCs 移植组少量表达, bFGF+BMSCs 移植组呈现低表达 ( $P < 0.05$ )。bFGF+BMSCs 移植组与 BMSCs 移植组、对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: BMSCs 与 bFGF 联合移植对大鼠脊髓损伤有修复作用, 机制可能与其降低 GFAP 表达及升高 NF-200 表达有关。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞; 成纤维细胞生长因子; 脊髓损伤; 神经丝蛋白-200; 胶质纤维酸性蛋白

中图分类号: R329.2

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2019.07.013

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Repair effect of bFGF combined with bone marrow mesenchymal stem cells on spinal cord injury in rats** HUANG Xing-rui\*, XU Hao, ZHANG Ye, JIANG Yuan-bin, XIA Chen-lin, and FANG Shu-chen. \*Department of Orthopaedics, the Second People's Hospital of Wujiang District, Suzhou 215221, Jiangsu, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the repair effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) combined with basic fibroblast growth factor (bFGF) on spinal cord injury in rats and explore its mechanism. **Methods:** SD rat BMSCs were obtained by serum culture technique. Eighty healthy 6-week-old male SD rats (weight about 240 g) were randomly divided into 4 groups with 20 each. The sham operation group underwent simple laminectomy without damaging spinal cord and was kept in the same condition as the other 3 groups. The other 3 groups underwent left T<sub>9</sub> spinal cord hemisection to establish spinal cord injury model. After 9 days of modeling the local transplantation was performed. The Control group was implanted with gelatin sponge containing normal saline. The BMSCs transplantation group was implanted with gelatin sponge containing BMSCs. The bFGF+BMSCs transplantation group was implanted with gelatin sponge containing bFGF+BMSCs. After 4 and 8 weeks, the expression of NF-200 and GFAP in injured spinal cord tissue was analyzed by Western blotting and the recovery of hind limb function was evaluated by Basso Beattie Bresnahan (BBB) motor function score scale. **Results:** The BBB scores of BMSCs transplantation group and bFGF+BMSCs transplantation group were better than control group at 4 and 8 weeks after operation ( $P < 0.05$ ) and there was significant difference between bFGF+BMSCs transplantation group and BMSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). After 4 and 8 weeks postoperatively, NF-200 expression was minimal in control group and only a small amount was expressed in BMSCs transplantation group while in bFGF+BMSCs transplantation group NF-200 was highly expressed ( $P < 0.05$ ). GFAP expression was high in control group, middle in BMSCs transplantation group and low in bFGF BMSCs transplan-

基金项目: 苏州吴江区卫计委“科教兴卫”项目(编号: WWK201623)

Fund program: Suzhou Wujiang District Health Planning Commission "Science and Education" Project (No. WWK201623)

通讯作者: 黄兴锐 E-mail: huangxingrui2008@163.com

Corresponding author: HUANG Xing-rui E-mail: huangxingrui2008@163.com

tation group ( $P < 0.05$ ). There was significant difference between bFGF+BMSCs transplantation group, BMSCs transplantation group and control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The combined transplantation of BMSCs and bFGF can repair the spinal cord injury in rats. The mechanism may be related to the decrease of GFAP expression and the increase of NF-200 expression.

**KEYWORDS** Bone marrow mesenchymal stem cells; Fibroblast growth factor; Spinal cord injury; Neurofilament protein-200; Glial fibrillary acidic protein

脊髓损伤是一种高发生率、高致残率以及高死亡率的疾病。一旦发生脊髓损伤,患者并发症多,生活质量显著下降,为家庭和社会带来沉重负担<sup>[1-2]</sup>。针对脊髓损伤,目前临床治疗方案主要有药物、手术、理疗、康复、高压氧等<sup>[3-5]</sup>。上述方法疗效不显著,患者常常伴随感觉、运动功能障碍等后遗症。因此,如何有效改善脊髓损伤后组织修复及功能恢复已成为学者们研究的热点。骨髓间充质干细胞是一种来源简便、无伦理学争议的成体干细胞,其体外分化能力极强,具备干细胞特性,已被成功用于治疗帕金森病、阿尔兹海默病等神经系统疾患<sup>[6-7]</sup>。碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)广泛存在于神经组织中,是目前研究比较热门的一种神经保护因子。Rabchevsky 等<sup>[8]</sup>研究发现 bFGF 在脊髓损伤后发挥重要作用,促进发育中的神经细胞分化和成熟,维持神经元正常功能,诱导突起向神经纤维生长。另有研究<sup>[9]</sup>表明 SCI 后应用外源性 bFGF 可以减轻神经元损伤,同时改善神经功能恢复。2016 年 9 月至 2018 年 3 月,笔者研究了 bFGF+BMSCs 联合移植对大鼠脊髓损伤的修复作用,同时对其相关机制进行探讨,结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

SD 雄性健康大鼠(重量约 240 g),苏州大学实验动物中心提供。主要试剂及仪器:MEM、DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司。胰酶(Sigma, 美国);细胞培养皿、24 孔培养板(Corning, 美国);PE-CD29 抗体、PE-CD90 抗体(E-BIOSCIENCE, 美国);流式细胞仪(Partec, 德国);MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 孵育箱(SANYO 公司);IX-70 型倒置显微镜(Olympus, 日本)等。

### 1.2 实验方法与步骤

**1.2.1 BMSCs 的分离培养** 成年大鼠颈椎脱臼处死后,用 75%乙醇浸泡 10 min,无菌条件下取出双侧股骨、胫骨,除去两端骨髓,暴露骨髓腔,无菌注射器抽吸培养液(MEM、10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、7.4%碳酸氢钠),反复冲洗骨髓腔,收集冲洗液摇匀、低速离心 5 min,倒出上清液,更新培养液重悬后过 100 目滤网,接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶,放置 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。24 h 后更换培养液(倒掉未贴壁的细胞及杂细胞),之后 3 d 换 1 次液。当细胞长满瓶底达 80%后 0.25%胰酶消化,

按 1:2 传代培养<sup>[10]</sup>。取第 3 代 BMSCs 用于本实验。使用流式细胞仪鉴定 CD29、CD90 表面标志。

**1.2.2 脊髓损伤模型制备、分组及移植方法** 80 只健康雄性 6 周龄 SD 大鼠(体重 240 g 左右)用于实验。造模:腹腔注射麻醉成功后,取俯卧位术区备皮,碘酒、酒精消毒,行左侧脊髓 T<sub>9</sub> 半切,切除左侧 3 mm 脊髓组织,使用 3 mm 纸片贴于脊髓表面以确保试验对象脊髓切除范围的均一性。所有 80 只大鼠随机分为 4 组,每组 20 只。假手术组单纯椎板切除,不造成脊髓损伤,与其余 3 组同条件饲养;其余 3 组均采用左侧 T<sub>9</sub> 脊髓半切,建立脊髓损伤模型。制模 9 d 后进行损伤局部移植治疗,对照组损伤处植入吸附有生理盐水的明胶海绵;BMSCs 移植组损伤处植入吸附有 BMSCs 的明胶海绵;bFGF+BMSCs 移植组损伤处植入吸附有 bFGF+BMSCs 的明胶海绵。参照 Garcia-Alias 等<sup>[11]</sup>研究,bFGF 剂量为 2 μg,明胶海绵 2 mm×2 mm×3 mm 体积大小。术后对大鼠辅助排便排尿,保温,护理等措施。

排除标准:脊髓半切后部分动物存在白质腹侧少许神经纤维残留,有助于自发性功能恢复。因此,如果大鼠术后 1~2 d 能使用伤侧后肢支撑体重行走,将其剔除实验。

### 1.3 观察项目与方法

**1.3.1 运动功能评估** 术后 4、8 周取每组各 10 只大鼠进行 BBB 评分量表<sup>[12]</sup>评分。将每只大鼠放置于宽阔地面,自由行走 5 min。两名实验观察者使用 BBB 评分标准对每只大鼠施行盲检。0 分为无任何肢体功能,21 分为正常运动功能。

**1.3.2 Western blotting 检测大鼠脊髓组织 NF-200 及 GFAP 表达水平** 术后 4、8 周每组各取 10 只大鼠麻醉断头,冰上快速分离 T<sub>7</sub>-T<sub>11</sub> 脊髓,加入蛋白裂解液匀浆,4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,取清液测定蛋白浓度,加样品 buffer 煮沸 10 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质;然后将分离后的蛋白转至 PVDF 膜上,封闭液室温封闭 2 h;倾倒入封闭液,加入一抗 NF-200/GFAP 4 °C 过夜;二抗 HRP 偶联的兔抗羊 IgG,摇床上室温杂交 2 h;ECL 试剂盒增强反应 2 min;曝光、洗片。采用 SigmaScan 及 GraphPad Prism 5 软件分析 NF-200、GFAP 表达水平。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,所有

定量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组之间数据比较采用单因素方差分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 运动功能评估结果

术后 4、8 周各组大鼠 BBB 评分结果见表 1。对照组大鼠运动功能较假手术组明显下降 ( $P<0.05$ )。与对照组相比, BMSCs 移植组、bFGF+BMSCs 移植组小鼠的运动功能得到改善 ( $P<0.05$ ); bFGF+BMSCs 移植组改善程度比 BMSCs 移植组更显著 ( $P<0.05$ )。

### 2.2 NF-200 及 GFAP 的表达水平的检测结果

NF-200 在对照组的损伤周围表达极低, BMSCs 移植组少量表达, bFGF+BMSCs 移植组呈高表达。结果见图 1。

GFAP 在对照组的损伤周围表达较高, BMSCs 移植组少量表达, bFGF+BMSCs 移植组呈低表达。结果见图 2。

## 3 讨论

随着现代工业、交通业快速发展,脊髓损伤的发病率逐年增高。常规治疗方法有激素冲击疗法、手术、高压氧疗、康复理疗等,除此之外,及时采用有效的改善神经功能修复措施,促进损伤后感觉、运动及反射功能恢复,无疑是临床工作中需要解决的难题。

表 1 术后 4、8 周各组大鼠 BBB 评分结果比较( $\bar{x}\pm s$ , 分)  
Tab.1 Comparison of rats BBB scores at 4, 8 weeks after operation among 4 groups( $\bar{x}\pm s$ , score)

组别	例数	术后 4 周	术后 8 周
假手术组	20	19.18±1.02	20.60±0.86
对照组	20	6.32±1.15 <sup>△</sup>	8.82±1.46 <sup>△</sup>
BMSCs 移植组	20	9.76±1.27*	14.20±1.78*
bFGF+BMSCs 移植组	20	12.30±1.74 <sup>#</sup>	18.64±1.35 <sup>#</sup>
<i>F</i> 值		86.37	36.82
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,  $\Delta P<0.05$ ; 与对照组比较, \* $P<0.05$ ; 与 BMSCs 移植组比较,  $\#P<0.05$

Note: Compared with sham operation group,  $\Delta P<0.05$ ; compared with control group, \* $P<0.05$ ; compared with BMSCs transplantation group,  $\#P<0.05$

传统观念认为,脊髓损伤后神经不能够再生。不过,近些年研究显示,中枢神经系统损伤后神经轴突具备再生能力,只是局部缺乏神经细胞以及良好的微环境,以致于常规治疗很难恢复损伤的结构和功能。因此,不少国内外研究专攻脊髓损伤后神经修复,诸如神经干细胞移植、嗅鞘细胞移植、神经营养因子应用、基因分子生物学治疗等。但目前为止,并没有哪一种治疗方案能够得到业界一致认同。该领域仍然

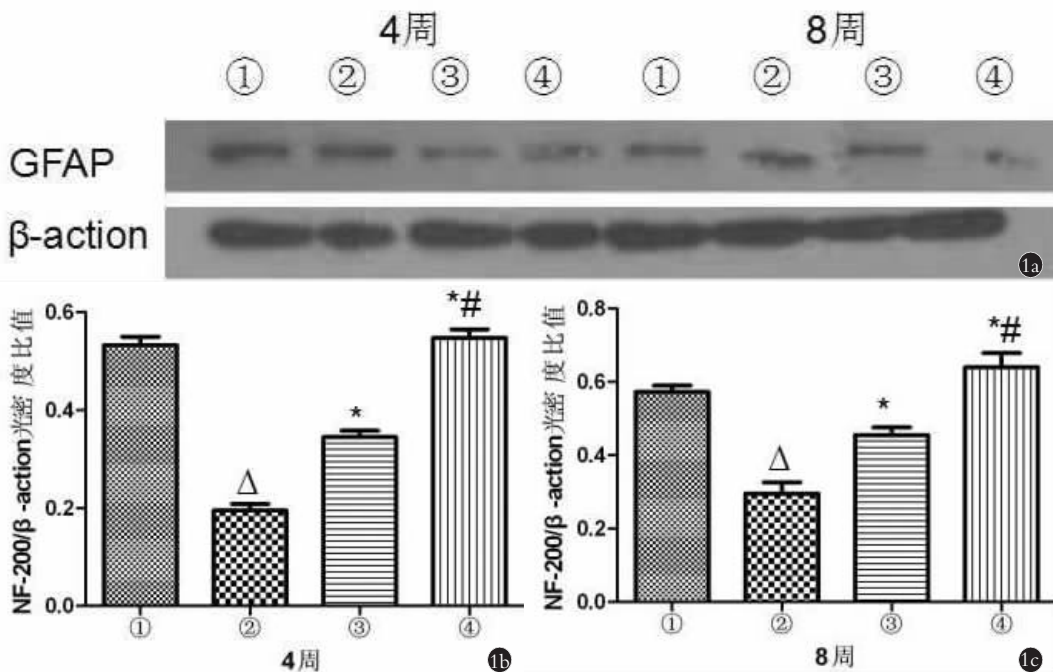


图 1 大鼠脊髓损伤节段的 NF-200 在各组中的表达: ①为假手术组 ②为对照组 ③为 BMSCs 移植组 ④为 bFGF+BMSCs 移植组 1a. NF-200 在各组中免疫印迹 1b, 1c. 术后 4、8 周 Western blotting 检测大鼠脊髓组织 NF-200/β-actin 光密度比值(与假手术组比较,  $\Delta F=22.16, P<0.05$ ; 与对照组比较, \* $F=26.83, P<0.05$ ; 与 BMSCs 移植组比较,  $\#F=44.25, P<0.05$ )

Fig.1 Expression of NF-200 in injured spinal cord segment of rats in each group. ① is sham operation group; ② is control group; ③ is BMSCs transplantation group; ④ is bFGF+BMSCs transplantation group 1a. NF-200 immunoblotting in each group 1b, 1c. NF-200/β-actin optical density ratio of rat spinal cord tissue detected by Western blotting at 4 and 8 weeks after operation (compared with sham operation group,  $\Delta F=22.16, P<0.05$ ; compared with control group, \* $F=26.83, P<0.05$ ; compared with BMSCs transplantation group,  $\#F=44.25, P<0.05$ )

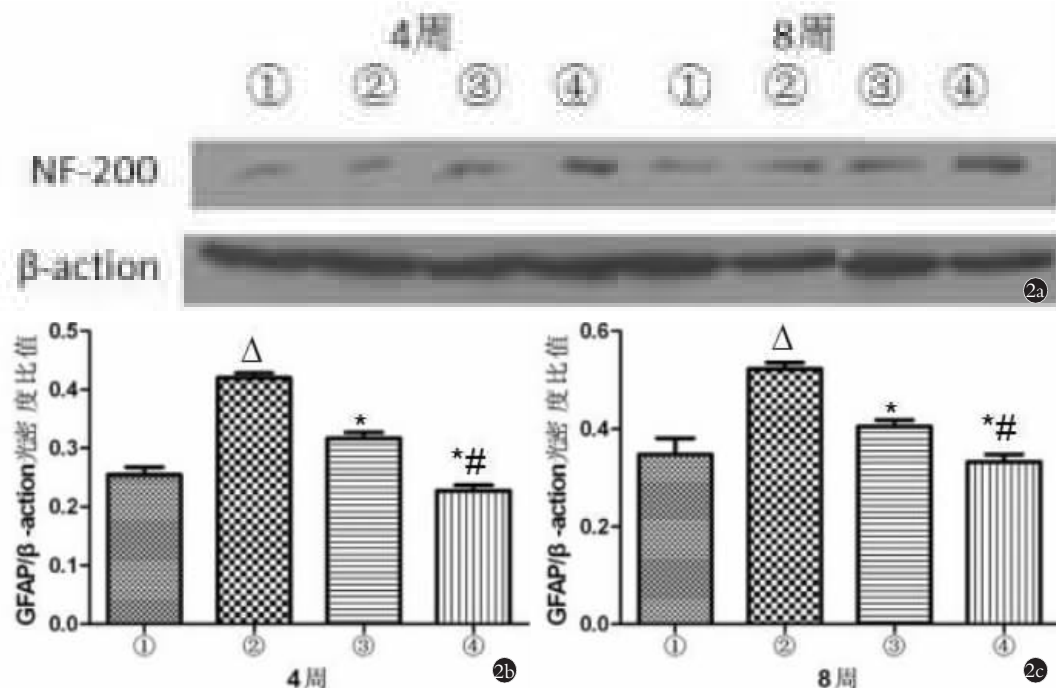


图 2 大鼠脊髓损伤节段的 GFAP 在各组中的表达:①为假手术组 ②为对照组 ③为 BMSCs 移植组 ④为 bFGF+BMSCs 移植组 2a. GFAP 在各组中免疫印迹 2b,2c. 术后 4,8 周 Western blotting 检测大鼠脊髓组织 GFAP/β-action 光密度比值(与假手术组比较,  $\Delta F=12.82, P<0.05$ ; 与对照组比较,  $*F=14.26, P<0.05$ ; 与 BMSCs 移植组比较,  $\#F=34.50, P<0.05$ )

Fig.2 Expression of GFAP in the spinal cord injury segment of rats in each group. ① is sham operation group; ② is control group; ③ is BMSCs transplantation group; ④ is bFGF+BMSCs transplantation group 2a. GFAP immunoblotting in each group 2b,2c. GFAP/β-action optical density ratio of rat spinal cord tissue detected by Western blotting at 4 and 8 weeks after operation (compared with sham operation group,  $\Delta F=12.82, P<0.05$ ; compared with control group,  $*F=14.26, P<0.05$ ; compared with BMSCs transplantation group,  $\#F=34.50, P<0.05$ )

处于探索阶段,由于伦理学方面等方面的局限,研究大多数只用于动物实验。

骨髓间充质干细胞具备以下优点:取材便捷、遗传因素稳定、移植后免疫排斥率低,没有伦理纠纷等。它已经成为移植治疗中枢神经系统疾病的重要干细胞来源<sup>[13-14]</sup>。Mead 等<sup>[15]</sup>采取骨髓间充质干细胞治疗退行性神经系统疾病,能显著改善神经元再生及功能修复,获得满意疗效。本研究结果显示,骨髓间充质干细胞可诱导分化神经元和神经胶质细胞,产生多种神经营养因子,明显降低神经元损伤,促进神经元再生,维持轴突及髓鞘结构的完整,抑制不利于神经再生的瘢痕形成。

有学者<sup>[15]</sup>研究发现 bFGF 在脊髓损伤后发挥着重要作用,是神经再生微环境的关键因素,是表达神经递质合成的关键酶,能够促进神经细胞的分化和成熟,维持神经元正常功能,促进神经元突起生长,诱导突起向神经纤维生长。另有研究<sup>[16]</sup>表明 SCI 后应用外源性 bFGF 可以减轻神经元损伤,同时局部微环境的 bFGF 浓度增高,可以抑制细胞的凋亡,提高神经细胞生存率,促进神经功能恢复。

本研究提示,bFGF 联合 BMSCs 可以有效改善大鼠的运动功能,恢复情况明显好于其他组,表明二

者联合具备良好的协同效应。GFAP 是神经胶质细胞的特异性生物标志,可以维持神经细胞结构和星形细胞形态及功能。但是,脊髓损伤后星形细胞胶质化具有双重效应,既能诱导神经纤维再生,又能形成大量胶质瘢痕,阻碍并抑制神经功能恢复。本实验中发现,bFGF 联合 BMSCs 组的 GFAP 表达低,表明该治疗组胶质瘢痕少,神经功能恢复效果佳。

NF-200 是神经元独有结构蛋白,主要存在于轴突中。脊髓损伤后,轴突变形、坏死,NF-200 表达量减少。损伤区的神经元在各种诱导因子作用下,NF-200 合成增多,并送达轴突以适应神经再生需要。在本实验中,bFGF 联合 BMSCs 组的 NF-200 表达明显高于其他组,功能恢复较好。因此,NF-200 的表达量能间接反映脊髓损伤后轴突损伤和修复程度。大量研究也表明<sup>[15-16]</sup>,保存残留轴突并促进其修复和再生是研究和治疗脊髓损伤的最核心内容。

总之,BMSCs 联合 bFGF 对大鼠脊髓损伤有修复作用,其机制可能与其降低 GFAP 表达及升高 NF-200 表达有关。

参考文献

[1] 张舵,贺西京. 锂剂治疗脊髓损伤机制的研究进展[J]. 中国骨伤,2015,28(7):679-682.

- ZHANG T, HE XJ. Advances in research on the mechanism of lithium in the treatment of spinal cord injury[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(7): 679-682. Chinese with abstract in English.
- [2] 王郦, 王倩, 张晓明. 骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 中国骨伤, 2014, 27(5): 437-440.
- WANG L, WANG Q, ZHANG XM. Advances in research of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(5): 437-440. Chinese with abstract in English.
- [3] Fakhoury M. Spinal cord injury: overview of experimental approaches used to restore locomotor activity[J]. Rev Neurosci, 2015, 26(4): 397-405.
- [4] Meurer WJ, Barsan WG. Spinal cord injury neuroprotection and the promise of flexible adaptive clinical trials[J]. World Neurosurg, 2014, 82(3-4): e541-e546.
- [5] Siddall PJ, Middleton JW. Spinal cord injury-induced pain: mechanisms and treatments[J]. Pain Manag, 2015, 5(6): 493-507.
- [6] Neirinckx V, Coste C, Rogister B, et al. Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play[J]. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(4): 284-296.
- [7] 王飞, 张晓君, 岳冀, 等. 丹酚酸 B 联合骨髓间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤修复作用研究[J]. 环球中医药杂志, 2012, 5(11): 804-807.
- WANG F, ZHANG XJ, YUE Y, et al. Effect of salviaolic acid B combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on repair of spinal cord injury in rats[J]. Huan Qiu Zhong Yi Yao Za Zhi, 2012, 5(11): 804-807. Chinese.
- [8] Rabchevsky AG, Fugaccia I, Fletcher-Turner A, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances tissue sparing and functional recovery following moderate spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 1999, 16: 817-830.
- [9] Takagi T, Kimura Y, Shibata S, et al. Sustained bFGF-release tubes for peripheral nerve regeneration; comparison with autograft[J]. Plast Reconstr Surg, 2012, 130: 866-876.
- [10] 黄兴锐, 朱云霞, 夏春林, 等. bFGF 与骨髓间充质干细胞联合移植对脑损伤神经再生的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(2): 129-134.
- HUANG XR, ZHU YX, XIA CL, et al. Effect of combined transplantation of bFGF and bone marrow mesenchymal stem cells on nerve regeneration in brain injury[J]. Shen Jing Jie Po Xue Za Zhi, 2009, 25(2): 129-134. Chinese.
- [11] Garcia-Alias G, Petrosyan HA, Schnell L, et al. Chondroitinase ABC combined with neurotrophin NT-3 Secretion and NR2D expression promotes axonal plasticity and functional recovery in rats with lateral hemisection of the spinal cord[J]. J Neurosci, 2011, 31: 17788-17799.
- [12] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat[J]. J Neurosurg, 1977, 47(4): 577-581.
- [13] Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome[J]. Brain Res, 2010, 1343: 226-235.
- [14] Li L, Lu G, Wang YF, et al. Glial cell-derived neurotrophic factor mRNA expression in a rat model of spinal cord injury following bone marrow stromal cell transplantation[J]. Neural Regen Res, 2008, 3(10): 1056-1059.
- [15] Mead B, Berry M, Logan A, et al. Stem cell treatment of degenerative eye disease[J]. Stem Cell Res, 2015, 14(3): 243-257.
- [16] Teng YD, Mocchiatti I, Taveira-Da Silva AM, et al. Basic fibroblast growth factor increases long-term survival of spinal motor neurons and improves respiratory function after experimental spinal cord injury[J]. J Neurosci, 1999, 19: 7037-7047.

(收稿日期: 2018-10-17 本文编辑: 王宏)