

人参与骨髓间充质干细胞移植对 脊髓损伤大鼠功能恢复的影响

王文奇¹, 李一帆¹, 张大威²

(1. 长春中医药大学基础医学院解剖与组胚教研室, 吉林 长春 130117;

2. 吉林大学白求恩医学院机能实验科学中心, 吉林 长春 130021)

【摘要】 目的 探讨人参与骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 移植联合治疗对脊髓损伤 (SCI) 大鼠功能恢复的影响。方法 将 48 只成年雌性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为 4 组, 每组 12 只。假手术组: 仅打开椎板暴露脊髓, 不造成脊髓损伤; SCI 模型组: 采用改良的 Allen 撞击法复制 SCI 模型, 术后不予以治疗; 甲泼尼龙组: SCI 术后静脉推注 (静推) 大剂量甲泼尼龙 (30 mg/kg) 冲击治疗, 4 h 后重复 1 次, 此后静推甲泼尼龙 30 mg/kg, 每日 2 次, 共 3 d; 人参 + BMSCs 组: SCI 术后服用人参超微粉碎颗粒 300 mg/kg, 每日 2 次, 共 20 d, 伤后 7 d 于损伤处移植大鼠 BMSCs 5 μ L, 浓度为 1×10^7 个/ μ L。各实验组定时观察行为学改变 (BBB 评分), 术后 30 d 在镀银染色下观察脊髓组织学的变化, 并检测大鼠神经电生理感觉诱发电位 (SEP)、运动诱发电位 (MEP) 水平。结果 假手术组术后双后肢均出现暂时性活动迟缓, 7 d 后功能恢复接近正常。SCI 模型组伤后出现双后肢瘫痪, 而甲泼尼龙组与人参 + BMSCs 组均有不同程度的功能恢复, 以人参 + BMSCs 组恢复较为明显, 达到假手术组水平。与假手术组比较, SCI 模型组术后不同时间点 BBB 评分均明显降低; 与 SCI 模型组比较, 甲泼尼龙组和人参 + BMSCs 组 BBB 评分均明显升高, 且以人参 + BMSCs 组升高更显著 (均 $P < 0.05$), 两组术后 12 d 开始差异即有统计学意义 (分: 5.23 ± 1.22 比 3.61 ± 1.03 , $P < 0.05$)。脊髓组织学检测显示: 假手术组脊髓组织结构完整, 神经元在灰质中分布均匀, 可见大量密集分布的银染阳性神经纤维, 相互平行, 规则排列; SCI 模型组可见组织结构不完整, 损伤区灰、白质缺损明显; 甲泼尼龙组和人参 + BMSCs 组组织坏死程度较 SCI 模型组有所减轻。神经电生理检测结果显示, SCI 模型组已失去正常波形; 甲泼尼龙组和人参 + BMSCs 组治疗后 SEP 与 MEP 潜伏期均较 SCI 模型组有不同程度缩短, 峰 - 峰值均较 SCI 模型组有显著增加, 其中人参 + BMSCs 组的变化优于甲泼尼龙组 [SEP: 潜伏期 (ms): 3.31 ± 0.36 比 4.66 ± 0.33 , 峰 - 峰值 (mV): 0.10 ± 0.01 比 0.05 ± 0.01 , MEP: 潜伏期 (ms): 3.40 ± 0.13 比 4.24 ± 0.31 , 峰 - 峰值 (mV): 41.12 ± 0.56 比 16.46 ± 2.83 , 均 $P < 0.05$]。结论 人参 + BMSCs 移植联合治疗能有效促进脊髓损伤大鼠功能的恢复。

【关键词】 人参; 骨髓间充质干细胞; 脊髓损伤

Effect of ginseng combined with transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on functional recovery of rats with spinal cord injury Wang Wenqi*, Li Yifan, Zhang Dawei. *Department of Anatomy & Histology & Embryology, School of Basic Medical Science, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin, China

Corresponding author: Li Yifan, Email: liyifan5697@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of ginseng combined with transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on functional recovery of rats with spinal cord injury (SCI). **Methods** Forty-eight female Wistar rats were randomly assigned to following four groups ($n = 12$ per group): the sham operation group was treated by opening the vertebral lamina and exposing spinal cord without SCI; the SCI model group was reproduced by using improved Allen bump method and afterwards no treatment was given; methyl prednisolone (MP) group was treated by MP pulse treatment after SCI, including intravenous injection of MP 30 mg/kg immediately after SCI and 4 hours later the same injection was repeated, and then the same intravenous injection 2 times daily, 3 days in total; The ginseng + BMSCs group was treated by orally taking ginseng ultra-microgranules 300 mg/kg after SCI, twice a day for 20 days and BMSCs 5 μ L (concentration 1×10^7 cell/ μ L) transplantation was carried out in SCI region on the 7th day after SCI. In the above 4 groups, the ethological observation (BBB scores) was done regularly and on the 30th day after operation, silver staining was applied to investigate the changes of spinal cord, and neuro-electrophysiological tests including somatosensory evoked potential (SEP) and motor evoked potential (MEP) were performed. **Results** In sham operation group, after surgery the movement of both hind limbs became temporarily sluggish and on the 7th day their functions recovered to approximately normal. In SCI model group, after injury paralysis of both hind limbs occurred, while in the MP group and ginseng + BMSCs group, different degrees of functional recovery of the injured limbs developed, and the recovery in ginseng + BMSCs group was more significant. Compared with sham operation group, after surgery the BBB score was reduced markedly at various time points in SCI model group; compared to the SCI model group, the BBB scores in MP and ginseng + BMSCs groups were increased significantly, especially more

remarkable in ginseng + BMSCs group (all $P < 0.05$), and beginning from the 12th day after operation, the difference became obvious (5.23 ± 1.22 vs. 3.61 ± 1.03 , $P < 0.05$). Histological detection showed that in sham operation group, the structure of spinal cord was complete, neurons distributed evenly in the gray matter and a large number of silver staining positive nerve fibers paralleled to each other and arranged regularly; in SCI model group, fragmented construction was present and the defects of gray and white matters were prominent. Compared with the SCI model group, the extents of tissue necrosis in MP and ginseng + BMSCs groups were ameliorated. The neuro-electrophysiological tests demonstrated that in SCI model group, the loss of normal wave form occurred. Compared with SCI model group, in MP and ginseng + BMSCs groups, after treatment latent periods (ms) were shortened prominently in different degrees of SEP and MEP, and their peak-to-peak values (mV) were increased obviously; the improvement in potential in ginseng + BMSCs group was greater than that in MP group [SEP: latent period (ms): 3.31 ± 0.36 vs. 4.66 ± 0.33 , peak-to-peak value (mV): 0.10 ± 0.01 vs. 0.05 ± 0.01 , MEP: latent period (ms): 3.40 ± 0.13 vs. 4.24 ± 0.31 , peak-to-peak value (mV): 41.12 ± 0.56 vs. 16.46 ± 2.83 , all $P < 0.05$]. **Conclusion** A combined treatment of ginseng and BMSCs transplantation can effectively promote the recovery of neural function for rats with SCI.

【Key words】 Ginseng; Bone marrow mesenchymal stem cell; Spinal cord injury

脊髓损伤 (SCI) 是临床常见的一种严重损伤, 致残率较高, 其主要原因为损伤区域神经元以及神经胶质细胞的丧失, 神经元及其突起再生能力不足^[1]。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 具有很强的分裂、复制和多向分化潜能, 业已成为基因工程和组织工程中理想的种子细胞, 具有促进损伤脊髓修复的作用^[2]。人参为五加科人参属的植物, 现代药理学研究显示其有效成分对中枢神经系统具有神经营养和保护作用, 能够抗衰老、抗氧化、抗细胞凋亡及抗兴奋性毒性^[3]。本研究旨在观察人参参与大鼠 BMSCs 移植联合治疗实验动物 SCI 后功能的恢复情况, 为相关 SCI 的临床治疗探索新的方法。

1 材料与方 法

1.1 大鼠 BMSCs 的分离和培养: 取 4 周龄 Wistar 大鼠, 颈椎脱臼法处死, 75% 乙醇消毒; 剥离股骨和胫骨, 剔除表面肌肉和筋膜, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗出骨髓; 300 目滤网过滤, 1000 r/min (离心半径 16 cm), 离心 10 min, 弃上清液, 贴壁法进行培养; 待贴壁细胞约 75% 融合时, 用 0.25% 胰酶酶消化贴壁细胞传代, 按 1:3 分瓶接种, 每隔 72 h 换液 1 次。

1.2 实验动物及分组: 选择 48 只体质量 210 ~ 260 g 的健康雌性 Wistar 大鼠, 由吉林大学白求恩医学院实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (吉) 2007-0003。按随机数字表法将大鼠分为 4 组, 每组 12 只。SCI 模型组行 SCI 手术。甲泼尼龙组于 SCI 后, 静脉推注 (静推) 甲泼尼龙 (30 mg/kg); 4 h 后重复 1 次; 此后每日 2 次, 共 3 d。人参 + BMSCs 组于早晚空腹给予人参超微粉碎颗粒 300 mg/kg, 每日 2 次, 共 20 d; SCI 后第 7 日, 用微量注射器于 SCI 处移植 BMSCs 5 μ l, 浓度为 1×10^7 个 / μ l。假手术组仅进行打开椎板手术暴露脊髓, 不造成 SCI。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 大鼠 SCI 模型复制: 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 以改良的 Allen 撞击器, 以 10 g 重的击打棒由 5 cm 高度自由落体, 致伤能量为 50 g·cm, 撞击部位为 T₁₀ 骨窗对应的脊髓组织, 以形成急性 SCI。此后, 每只大鼠腹腔注射氨苄青霉素 80 kU/d, 持续 7 d。定时定量予以喂养, 不限制饮水, 同时人工辅助排尿, 直至实验动物恢复排尿反射。实验大鼠均在饲养 30 d 后进行取材。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 行为学观察: 评价 SCI 大鼠的功能恢复情况 (即 BBB 评分), 共 21 级。采用双人独立观察并评分, 取其均值。每 6 d 定时检测大鼠双后肢运动功能的恢复状况。

1.4.2 脊髓组织学观察: 术后 30 d, 每组取 6 只大鼠, 腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉, 以 4% 多聚甲醛水溶液进行灌流固定, 暴露脊髓 T₈ 至 T₁₂, 取出脊髓组织, 以 4% 多聚甲醛水溶液再固定 4 h, 梯度蔗糖溶液脱水, 于冰冻切片包埋剂 (OCT) 中浸泡 10 min, 置入冷丙酮中冷冻后, -70 °C 保存, 冠状面切片 (厚 15 μ m), 镀银染色, 光镜下观察脊髓组织学改变。

1.4.3 神经电生理检测: SCI 术后 30 d, 各实验组取剩余 6 只大鼠, 用 BL-410 生物功能实验系统和 Powerla 诱发电位仪检测感觉诱发电位 (SEP)、运动诱发电位 (MEP), 测量其峰 - 峰值和潜伏期。刺激参数为输出电压、频率 10 Hz、波宽 1 ms、强度 3 V。

1.5 统计学分析: 使用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为学变化 (表 1): 术前全部实验动物双后肢 BBB 评分均为 21 分。假手术组术后双后肢均出现

暂时性活动迟缓,2 d 后有明显恢复,7 d 后功能恢复接近正常。SCI 模型组伤后均出现双后肢瘫痪,术后 1 周内未见功能改善,2 周开始恢复,且恢复缓慢,只能恢复后肢部分关节广泛运动。甲泼尼龙组与人参 + BMSCs 组术后通过治疗均有不同程度的功能恢复,以人参 + BMSCs 组恢复较为明显。与假手术组比较,SCI 模型组术后不同时间点 BBB 评分均明显降低;与 SCI 模型组比较,甲泼尼龙组和人参 + BMSCs 组 BBB 评分均升高,以人参 + BMSCs 组升高更显著 ($P < 0.05$)。

2.2 脊髓组织学镀银染色结果:假手术组组织结构完整,神经元在灰质中分布均匀、可见大量密集分布的银染阳性神经纤维,相互平行,规则排列(图 1a)。SCI 模型组可见组织结构不完整,损伤区灰质、白质缺损明显,损伤区域内未见到正常的神经元存在(图 1b)。甲泼尼龙组组织结构也不完整,坏死程度较 SCI 模型组有所减轻,可见少量的神经元和弯曲、排列杂乱的神经纤维(图 1c)。人参 + BMSCs 组组织结构基本完整,恢复程度明显优于甲泼尼龙组,神经元数量较多,银染阳性神经纤维丰富(图 1d)。

2.3 神经电生理检测结果(表 2;图 2):SCI 模型组已失去正常波形,SEP 与 MEP 潜伏期均较假手

表 1 各组大鼠术后不同时间点运动功能 BBB 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	BBB 评分(分)				
		术后 6 d	术后 12 d	术后 18 d	术后 24 d	术后 30 d
假手术组	12	19.58 ± 0.75	20.79 ± 0.11	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00
SCI 模型组	12	0.71 ± 0.51 ^a	2.39 ± 1.05 ^a	4.66 ± 1.45 ^a	5.54 ± 1.05 ^a	5.56 ± 1.04 ^a
甲泼尼龙组	12	1.55 ± 0.53 ^a	3.61 ± 1.03 ^a	5.21 ± 1.16 ^a	6.41 ± 1.19 ^a	7.07 ± 0.59 ^a
人参 + BMSCs 组	12	1.64 ± 0.61 ^{ab}	5.23 ± 1.22 ^{abc}	7.79 ± 1.41 ^{abc}	9.61 ± 1.51 ^{abc}	12.25 ± 1.03 ^{abc}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 SCI 模型组比较,^b $P < 0.05$;与甲泼尼龙组比较,^c $P < 0.05$

表 2 各组 SEP、MEP 峰 - 峰值、潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	SEP		MEP	
		潜伏期 (ms)	峰 - 峰值 (mV)	潜伏期 (ms)	峰 - 峰值 (mV)
假手术组	6	2.04 ± 0.02	0.15 ± 0.01	2.01 ± 0.02	88.66 ± 0.51
SCI 模型组	6	5.24 ± 0.25 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	4.83 ± 0.25 ^a	5.83 ± 1.03 ^a
甲泼尼龙组	6	4.66 ± 0.33 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}	4.24 ± 0.31 ^a	16.46 ± 2.83 ^{ab}
人参 + BMSCs 组	6	3.31 ± 0.36 ^{abc}	0.10 ± 0.01 ^{abc}	3.40 ± 0.13 ^{abc}	41.12 ± 0.56 ^{abc}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 SCI 模型组比较,^b $P < 0.05$;与甲泼尼龙组比较,^c $P < 0.05$

术组明显延长,峰 - 峰值明显降低。甲泼尼龙组和人参 + BMSCs 组治疗后 SEP 与 MEP 潜伏期较 SCI 模型组缩短,峰 - 峰值均较 SCI 模型组显著增加,其中人参 + BMSCs 组改善程度优于甲泼尼龙组 ($P < 0.05$),恢复程度更接近假手术组。

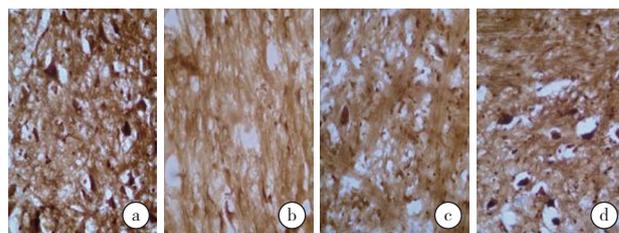


图 1 各组 SCI 大鼠脊髓组织学改变(镀银染色 高倍放大)



图 2 各组 SCI 大鼠 SEP 和 MEP 波形

图 2 各组 SCI 大鼠 SEP 和 MEP 波形

3 讨论

SCI 是骨外科常见的严重疾患,其预后不良的主要原因在于原发性损伤及其发展而来的一系列继发性损伤^[4]。因此,临床治疗多采用改善微循环与保护和营养神经细胞的方法,以减轻继发损伤^[5-7]。甲泼尼龙为一种人工合成的糖皮质激素,目前在 SCI 的临床治疗中应用广泛,但是甲泼尼龙可引起抵抗力下降、肝损害、免疫抑制、骨坏死等并发症,且不良反应较多^[8]。祖国医学认为,人参具有安精神、补五脏、定魂魄、明目开心益智、止惊悸、久服而延年益寿的作用^[9]。现代医学研究表明,人参中的人参皂苷等有效成分可以通过改善微循环、提高机体耐缺氧能力、清除机体自由基等机制抑制继发性损伤因素从而起到治疗 SCI 的作用。与此同时,人参基本无毒副作用,避免了甲泼尼龙引发的多种不良反应^[10-12]。BMSCs 具有多向分化潜能,可降低炎症因子水平^[13],移植后可显著改善动物的运动功能^[14]。BMSCs 移植可代替死亡神经细胞,弥补组织损伤。同时, BMSCs 还可以分化为神经胶质细胞进而通过分泌神经营养因子以及血管内皮生长因子等途径促进损伤后结构与功能的恢复^[15-16]。

本研究结果显示,反映脊髓的感觉和运动传导功能的 SEP 和 MEP 在 SCI 模型组均未见明显恢复,与假手术组以及两个治疗组相差甚远;甲泼尼龙组和人参 + BMSCs 组均有不同程度的恢复,而人参 + BMSCs 组最接近假手术组,其潜伏期和峰 - 峰值虽未完全恢复到假手术组的程度,但与甲泼尼龙组比较差异有统计学意义。在验证甲泼尼龙疗效的同时,亦说明人参结合 BMSCs 的疗效更为理想。受试大鼠 MEP 的结果与其后肢运动功能 BBB 评分相符,表现为 BBB 评分升高。同时,以上两项指标与镀银染色观察结果相吻合,神经纤维修复较好的实验组运动功能与电生理指标改善也明显。

综上所述, BMSCs 移植能弥补 SCI 原发性损伤造成的组织细胞缺损;人参的多种活性物质可抑制继发性损伤因素所产生的作用,同时避免了激素引起的不良反应。两者联合治疗能明显促进 SCI 大鼠神经组织结构与功能恢复。本实验初步尝试了中西医结合治疗 SCI,结果为采用中医中药与现代干细

胞移植技术相结合治疗 SCI 提供了新的思路与实验依据。

参考文献

- [1] Garbossa D, Fontanella M, Fronda C, et al. New strategies for repairing the injured spinal cord: the role of stem cells [J]. *Neurol Res*, 2006, 28 (5): 500-504.
- [2] Novikova LN, Brohlin M, Kingham PJ, et al. Neuroprotective and growth-promoting effects of bone marrow stromal cells after cervical spinal cord injury in adult rats [J]. *Cytotherapy*, 2011, 13 (7): 873-887.
- [3] 孟凡洁,李一帆,张大威,等. 人参与大鼠羊膜上皮细胞移植对脊髓损伤大鼠功能恢复的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19 (1): 12-15.
- [4] Yazdani SO, Pedram M, Hafizi M, et al. A comparison between neurally induced bone marrow derived mesenchymal stem cells and olfactory ensheathing glial cells to repair spinal cord injuries in rat [J]. *Tissue Cell*, 2012, 44 (4): 205-213.
- [5] 冷玉鑫,聂春艳,姚智渊,等. 急性重度外伤性颈脊髓损伤患者早期死亡的危险因素分析[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (5): 294-297.
- [6] Zurita M, Otero L, Aguayo C, et al. Cell therapy for spinal cord repair: optimization of biologic scaffolds for survival and neural differentiation of human bone marrow stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2010, 12 (4): 522-537.
- [7] Pal R, Gopinath C, Rao NM, et al. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury [J]. *Cytotherapy*, 2010, 12 (6): 792-806.
- [8] 郭彦聪,李荣芬,王小光,等. 人参和泼尼松对关木通致大鼠急性肾毒性的干预作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12 (5): 292-296.
- [9] 李刚,徐亚平,岳旭,等. 人参总皂甙对大鼠脑缺血时脑微血管及脑组织中一氧化氮合酶的影响及脑保护作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12 (3): 140-143.
- [10] 赵东旭,袁洪萍,朱庆三,等. 人参皂甙对大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13 (1): 35-37.
- [11] 宋永兴,金才益,曾忠友,等. 人参皂甙对大鼠急性脊髓损伤的保护作用及其机制[J]. *海南医学*, 2009, 20 (5): 6-9.
- [12] 杨洁,吴大玮,唐琳娜,等. 比较不同剂量地塞米松对小鼠脓毒症致急性肾损伤的保护作用[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (7): 424-428.
- [13] 陈肖,梁欢,连洁,等. 骨髓间充质干细胞对创伤弧菌脓毒症肺损伤的保护作用[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (11): 821-826.
- [14] Park HW, Lim MJ, Jung H, et al. Human mesenchymal stem cell-derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, via distinct growth factor production, in a model of spinal cord injury [J]. *Glia*, 2010, 58 (9): 1118-1132.
- [15] Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2012, 235 (1): 78-90.
- [16] Wu B, Sun L, Li P, et al. Transplantation of oligodendrocyte precursor cells improves myelination and promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. *Injury*, 2012, 43 (6): 794-801.

(收稿日期: 2014-05-12)

(本文编辑: 李银平)