

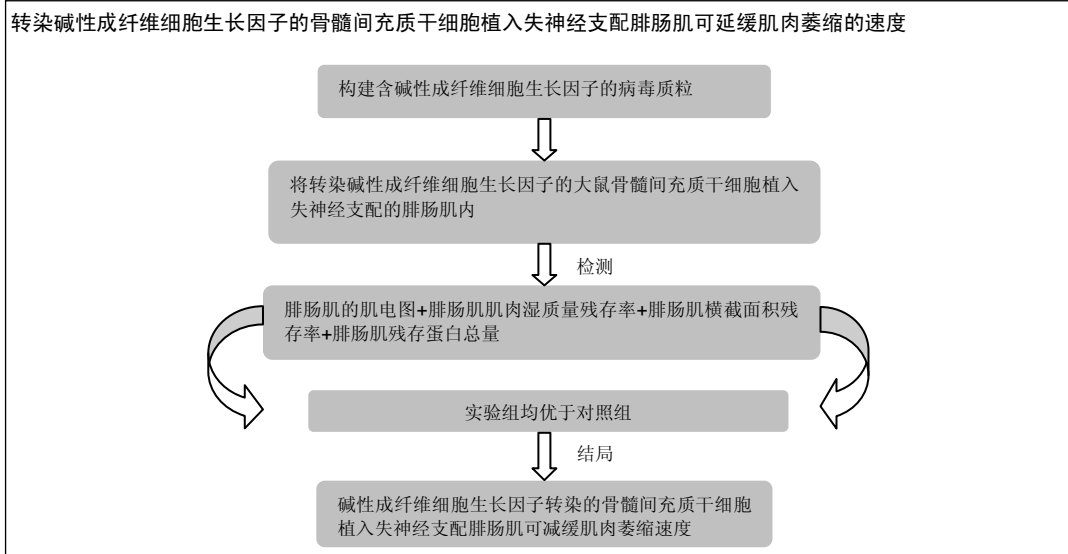
碱性成纤维细胞生长因子基因转染骨髓间充质干细胞在失神经肌肉萎缩中的应用

于宁¹, 王彦生¹, 齐常萍²(沈阳医学院附属中心医院, ¹手外五科, ²手外二科, 辽宁省沈阳市 110024)

引用本文: 于宁, 王彦生, 齐常萍. 碱性成纤维细胞生长因子基因转染骨髓间充质干细胞在失神经肌肉萎缩中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):89-94.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.016 ORCID: 0000-0003-4542-5670(于宁)

文章快速阅读:



于宁, 男, 1980年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2007年中国医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事周围神经损伤方面的研究。

通讯作者: 王彦生, 硕士, 主任医师, 沈阳医学院附属中心医院手外五科, 辽宁省沈阳市 110024

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)01-0089-06

稿件接受: 2015-11-15

http://www.crter.org

文题释义:

失神经骨骼肌萎缩: 骨骼肌是周围神经系统的靶器官, 其发生、结构和功能的维持均由神经支配和调节, 一旦失去神经支配, 骨骼肌的体积将很快缩小并失去收缩功能, 肌纤维会发生显著变化, 包括运动终板丧失、肌细胞直径和截面积缩小、细胞浆丢失、肌纤维排列紊乱、细胞核相互靠近、肌丝疏散、肌浆蛋白和肌原纤维蛋白含量下降等。

碱性成纤维细胞生长因子: 是成纤维细胞生长因子家族的基本成员, 在多种细胞的增殖、迁移、分化和生存中起到重要的支持作用, 也是一种强大的毛细血管增殖刺激剂, 能为骨髓间充质干细胞生长提供充足的血供和营养。

摘要

背景: 如何避免失神经性肌萎缩是提高外周神经损伤疗效的关键因素。

目的: 探讨碱性成纤维细胞生长因子基因转染骨髓间充质干细胞预防失神经支配肌肉萎缩的作用。

方法: 通过病毒转染的方法将碱性成纤维细胞生长因子基因转染入大鼠骨髓间充质干细胞, 应用 MTT 法、免疫组化、苏木精-伊红染色光镜观察、RT-PCR、Western blotting 及 ELISA 法检测碱性成纤维细胞生长因子基因转染骨髓间充质干细胞的效果及产物的表达。取 32 只 SD 大鼠建立坐骨神经损伤模型, 实验组肌肉多点注射碱性成纤维细胞生长因子基因转染的骨髓间充质干细胞, 对照组注射细胞培养液, 移植后 2, 4, 6, 8 周腓肠肌取材, 检测腓肠肌动作电位、残余湿质量、肌纤维横截面积等指标。

结果与结论: ①通过病毒转染的方法, 成功将碱性成纤维细胞生长因子基因转染入骨髓间充质干细胞。②检测腓肠肌肌肉湿质量残存率、腓肠肌横截面积及肌细胞直径残存率、残存腓肠肌动作电位等指标, 实验组均优于对照组 ($P < 0.05$)。③结果表明碱性成纤维细胞生长因子基因转染的骨髓间充质干细胞植入失神经肌肉中, 可减缓肌肉萎缩速度。

关键词:

干细胞; 培养; 碱性成纤维细胞生长因子; 基因转染; 骨髓间充质干细胞; 肌肉萎缩

主题词:

骨髓; 间质干细胞移植; 成纤维细胞生长因子 2; 肌疾病, 萎缩性; 组织工程

基金资助:

辽宁省科技计划项目(2012225019)

缩略语:

碱性成纤维细胞生长因子: basic fibroblast growth factor, bFGF

Yu Ning¹, Wang Yan-sheng¹, Qi Chang-ping² (Fifth Department of Hand Surgery, ²Second Department of Hand Surgery, Central Hospital of Shenyang Medical University, Shenyang 110024, Liaoning Province, China)

Yu Ning, Master, Attending physician, Fifth Department of Hand Surgery, Central Hospital of Shenyang Medical University, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wang Yan-sheng, Master, Chief physician, Fifth Department of Hand Surgery, Central Hospital of Shenyang Medical University, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Fibroblast Growth Factor 2; Muscular Disorders, Atrophic; Tissue Engineering
Funding: the Scientific Plan Project of Liaoning Province, No. 2012225019

Application of basic fibroblast growth factor gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells in denervated muscle atrophy

Abstract

BACKGROUND: How to avoid denervated muscular atrophy is a key factor to improve the therapeutic efficacy on peripheral nerve injuries.

OBJECTIVE: To study the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells against denervated muscle atrophy.

METHODS: bFGF genes were transfected into rat bone marrow mesenchymal stem cells using viral transfection method, and then MTT, immunohistochemical staining, hematoxylin-eosin staining, RT-PCR, western blot, and ELISA methods were used to detect the transfection efficiency and product expression. Thirty-two Sprague-Dawley rats were selected to make animal models of sciatic nerve injury, and subjected to multi-point intramuscular injection of bFGF-transfected bone marrow mesenchymal stem cells (experimental group) or cell culture fluid (control group). At 2, 4, 6, 8 weeks after transfection, the gastrocnemius muscle tissues were harvested to detect action potential, residual wet weight, and cross-sectional area of muscle fibers.

RESULTS AND CONCLUSION: The bFGF gene was successfully transfected into bone marrow mesenchymal stem cells using the viral transfection method. The residual wet weight, cross-sectional area and residual action potential of the gastrocnemius muscle were significantly better in the experimental group than the control group ($P < 0.05$). These findings indicate that bFGF gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells transplanted into the denervated muscle can retard the development of muscle atrophy.

Cite this article: Yu N, Wang YS, Qi CP. Application of basic fibroblast growth factor gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells in denervated muscle atrophy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):89-94.

0 引言 Introduction

周围神经损伤后, 其支配的骨骼肌将不可避免地发生萎缩。目前防治肌萎缩的方法主要有两条途径: 一是加速神经的再生, 如应用显微外科技术进行神经外膜或神经束膜缝合, 为加速神经轴突通过吻合口创造有利条件, 为防止和延缓失神经肌萎缩赢得了时间。二是防止失神经肌萎缩的发生与发展。周围神经对骨骼肌不仅具有支配作用, 而且对骨骼肌具有营养作用, 因此骨骼肌失神经萎缩既是失营养性萎缩, 又是失用性萎缩。大量的实验研究表明, 骨骼肌损伤后发生萎缩伴随着复杂的生物学调节机制, 与大量的细胞生长因子相关^[1-3]。实验将具有多重生物学效应的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)基因转入大鼠骨髓间充质干细胞, 获得能持续表达bFGF的骨髓间充质干细胞, 通过局部注射方法来预防和治疗失神经后肌萎缩。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比动物实验研究。

1.2 时间及地点 实验于2014年3月至2015年6月在沈阳医学院附属中心医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康成年SD大鼠33只(细胞培养1只, 造模32只), 体质量150 g左右, 雌雄不限, 由中国医科大学动物实验室提供。

1.3.2 药品和试剂 bFGF片段(武汉博士德生物), 细胞转染试剂盒、ELISA试剂盒(美国R&D公司), bFGF试剂盒(上海沪峰生物科技有限公司, FA01598B), bFGF抗体(武汉博士德生物, BA0259), PCR引物合成公司(南京金斯瑞科技有限公司), cDNA第一链合成试剂盒(美国 Thermo

Fisher, K1622), Taq DNA Polymerase(美国 Thermo Fisher, EP0405), PCR仪(美国ABI公司); 核酸电泳仪(北京六一厂), 凝胶成像仪(美国 BIO公司), 紫外光度仪(日本 SHIMADZU公司, UV-2450)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞体外分离培养和鉴定 取健康成年SD大鼠, 1 g/L新洁尔灭浸泡30 min后, 断颈处死, 碘伏消毒, 体积分数为75%乙醇消毒, 铺无菌单, 无菌条件下取双侧股骨、胫骨, 除去骨表面附着的软组织, DMEM浸泡清洗, 用弯钳将两端骨骺切除, 显露骨髓腔。用10 mL注射器吸取DMEM培养液冲洗骨髓腔, 以冲出骨髓, 轻轻吹打, 制成单细胞悬液, 1 000 r/min离心20 min, 离心后去上清, 用完全培养液重悬, 接种于25 mL塑料培养瓶中, 置37 ℃、体积分数为5%CO₂饱和湿度条件下培养。于培养后的第3天更换培养液, 待细胞汇合约80%时, 用胰蛋白酶消化, 按1:2传代培养。

1.4.2 基因转染与鉴定 骨髓间充质干细胞消化、计数、配制成细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 6孔细胞培养板中每孔加入800 μL细胞悬液, 每孔加入200 μL ENI.S, 将病毒稀释至终浓度为 $1 \times 10^{11} \text{ TU/L}$, 每孔加入Polybrene至终质量浓度为5 mg/L, 孵育12-24 h, 继续培养一两天。用免疫组化、苏木精-伊红染色、RT-PCR、Western blotting、ELISA法及MTT法检测bFGF基因转染骨髓间充质干细胞的效果及产物的表达。

苏木精-伊红染色: 将骨髓间充质干细胞涂片放入40 g/L多聚甲醛固定液固定30 min, 试剂一核染液染缸内染色5 min, 试剂二分色液I中20 s, 试剂三分色液II中40 s, 试剂四浆染液中染色2 min, 试剂五增色液洗液, 封固、镜检。

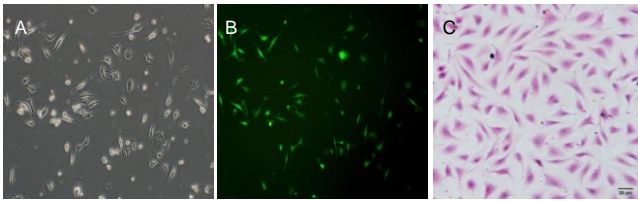


图1 病毒转染前后SD大鼠骨髓间充质干细胞形态(x200)
Figure 1 Morphology of Sprague-Dawley rat bone marrow mesenchymal stem cells before and after viral transfection (x200)
图注: 图中A为未转染的骨髓间充质干细胞; B为bFGF转染后的骨髓间充质干细胞; C为转染后细胞进行苏木精-伊红染色。

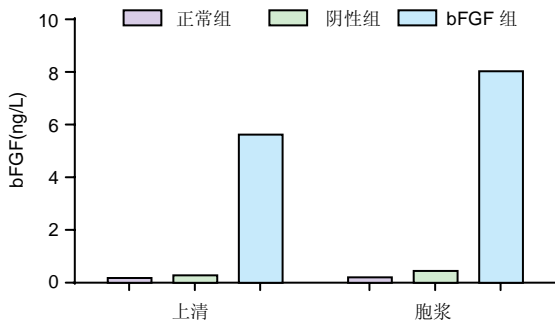


图3 ELISA检测转染后细胞胞浆和上清液中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)含量
Figure 3 ELISA detection of basic fibroblast growth factor content in the cytoplasm and cell supernatant after transfection

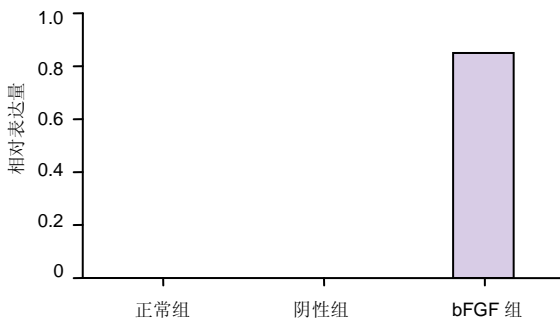


图5 Western blotting检测各组骨髓间充质干细胞中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)蛋白表达
Figure 5 Western blot detection of basic fibroblast growth factor protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells

免疫组化染色: 将骨髓间充质干细胞涂片放入40 g/L多聚甲醛固定液中30 min, 封闭, 滴加即用型山羊血清50-100 μL, 室温孵育20 min。滴加一抗(1:10稀释)50-100 μL, 37 °C孵育2 h, 加增强剂50 μL, 室温孵育30 min。滴加通用型IgG抗体-Fab段-HRP多聚体50 μL, 室温37 °C孵育30 min。DAB溶液显色, 复染, 脱水, 封固, 镜检。以转染空白质粒为正常组, 以未转染为阴性组。

ELISA检测bFGF含量: 分别设空白孔(标准品稀释液)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品及待测样品孔中准确加入100 μL。用封板模封板后置37 °C温育90 min。将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水20倍稀释后备用。洗涤, 甩干, 重复5次, 加生物素化抗体按1:30用抗体

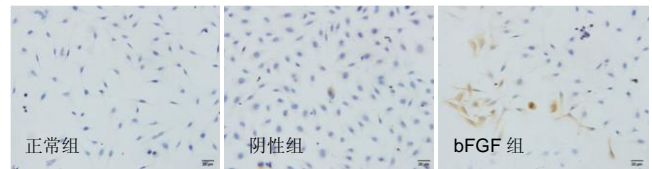


图2 免疫组化染色检测碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达(x200)
Figure 2 Immunohistochemical detection of basic fibroblast growth factor gene expression (x200)
图注: 转染组细胞碱性成纤维细胞生长因子呈阳性表达, 细胞胞浆染成黄褐色。正常组及阴性组无表达。

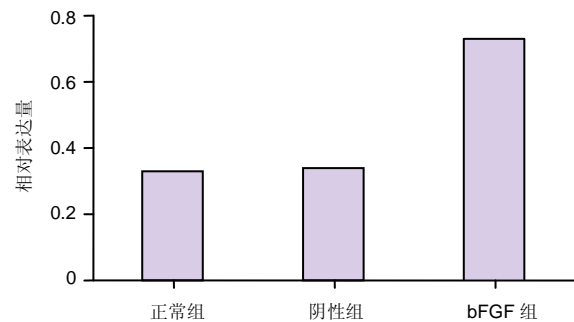


图4 RT-PCR检测各组骨髓间充质干细胞中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)mRNA表达
Figure 4 RT-PCR detection of basic fibroblast growth factor mRNA expression in bone marrow mesenchymal stem cells

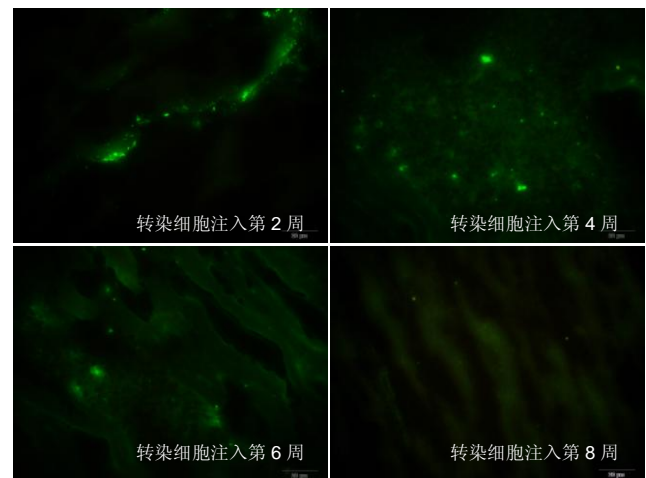


图6 骨髓间充质干细胞移植后生长迁移情况(x200)
Figure 6 Growth and migration of bone marrow mesenchymal stem cells after transplantation (x200)
图注: 实验组移植后不同时间点的腓肠肌标本冰冻切片荧光显微镜下可观察到标记的骨髓间充质干细胞, 随着时间的延长, 标记骨髓间充质干细胞逐渐减少。

稀释液稀释, 每孔加入100 μL, 空白孔除外。用封板模封板后置37 °C温育60 min。加酶, 显色, 终止, 以空白孔调零, 450 nm波长依序测量各孔的吸光度。以转染空白质粒为正常组, 以未转染为阴性组。

RT-PCR检测bFGF表达: 将细胞悬液加入1 mL预冷的Trizol, 转移至1.5 mL离心管中, 放置5 min, 使得核酸蛋白复合物完全分离。加入氯仿, 室温静置3 min, 然后2 000×g, 4 °C离心15 min, 样品分为3层, 无色的上清水

相、中间的白色层、粉红色的下层有机相, 小心吸取无色上清水相移至另一离心管, 加入等体积的异丙醇, 轻轻混匀, 室温静置10 min, 12 000×g, 4 °C离心10 min, 小心去除上清, 加入1 mL体积分数为70%的乙醇, 12 000×g, 4 °C离心10 min, 加入30–50 μL的无RNase水溶解RNA沉淀, -70 °C保存。取5 μL RNA样品到495 μL 1×TE Buffer中, 测定样品在260 nm和280 nm的吸收值, 测定RNA的浓度, 合成cDNA第一链, 进行琼脂糖凝胶电泳检测。以转染空白质粒为正常组, 以未转染为阴性组。引物序列及PCR产物大小: Rat-GAPDH primer (352 bp): Sense primer: 5'-AAG GTC GGT GTG AAC GGA TTT-3', Antisense primer: 5'-AGA TGA TGA CCC TTT TGG CCC-3'; Rat-bFGF primer (345 bp): Sense primer: 5'-TCG GTC TCT CGG CTT CAG G-3', Antisense primer: 5'-ACA CCC AGC GAG AAG AGG G-3'。

Western blotting检测bFGF表达: 将细胞悬液用胰酶消化后, 加入200 μL冰预冷裂解缓冲液, 每隔5 min涡旋振荡10 s, 4 °C, 13 000×g离心10 min。将上清分装, 备用。BCA法蛋白浓度的测定, 测定样品和标准品在520 nm波长的吸光度值。根据蛋白标准品的浓度标准曲线, 计算出各组样品的蛋白浓度。SDS-PAGE电泳, 聚合成胶, 加入1×Tris-Gly的电泳缓冲液, 电泳, NC转膜, 封闭。将膜放入含一抗(用Western一抗稀释液稀释)的平皿中, 4 °C摇床振荡孵育过夜。吸弃一抗, 用5%脱脂奶粉封闭液稀释二抗, 室温摇床振荡反应2 h。洗膜, 显色使用G:BOX chemiXR5成像, Gel-Pro32软件对结果进行灰度分析。以转染空白质粒为正常组, 以未转染为阴性组。

MTT法细胞增殖活力: 取转染后第3代细胞和未转染细胞以 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度(100 μL)接种于7块96孔板, 加入含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液, 置于体积分数为5%CO₂、37 °C饱和湿度条件下培养。细胞贴壁后, 每天同一时间点取出一块培养板, 采用MTT法进行检测。以时间为横轴, 吸光度值为纵轴, 绘制细胞生长曲线。

1.4.3 实验动物模型的建立和分组 SD大鼠32只随机分为实验组和对照组, 每组16只。1%异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 局部备皮、消毒、铺无菌手术巾, 切开皮肤, 分离股部肌肉显露坐骨神经, 于梨状肌下缘将其切断, 神经近端自然回缩, 远端反折后固定于肌肉上, 制成坐骨神经失神经支配肌肉萎缩模型。造模后即刻注射细胞悬液0.2 mL ($1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$)于实验组动物右侧腓肠肌内, 共注射9个点(1.8 mL), 注射后留针约1 min, 以防注射液倒流。对照组采用同样方法在右侧腓肠肌内注射细胞培养液。术毕缝合手术切口, 腹腔内注射庆大霉素, 预防感染。术后实验组和对照组动物分笼饲养。

1.5 主要观察指标

1.5.1 骨髓间充质干细胞移植后生长迁移情况 移植后2, 4, 6, 8周取材(每个时间点4只), 取腓肠肌肌肉组织标本,

制备冰冻切片, 荧光显微镜观察细胞生长迁移情况。

1.5.2 一般情况观察 术后定期观察大鼠的姿态、步态、肢端溃疡及自残现象。

1.5.3 大鼠腓肠肌运动单位电位和纤颤电位 移植后2, 4, 6, 8周应用丹麦ESAOTE PHASIS肌电仪, 采用单极针电极技术测定腓肠肌纤颤电位波幅, 记录波幅最大的20个电位, 取其平均值。

1.5.4 腓肠肌湿质量残存率 移植后2, 4, 6, 8周麻醉后将大鼠放血致死, 尽可能排空身体所有血液, 使取下的肌肉不含血液, 以免影响实验结果。从肌肉的起点至终点切取腓肠肌, 大体观察后电子天平称质量。湿质量残存率=手术侧残存肌肉湿质量/未手术侧残存肌肉湿质量×100%。

1.5.5 腓肠肌肌纤维横截面积及肌纤维细胞直径 移植后2, 4, 6, 8周, 将取下的肌肉称质量后放入多聚甲醛溶液中固定, 应用乙醇逐级脱水, 石蜡包埋, 行苏木精-伊红染色、Mallory三色染色, 利用图像分析仪测量肌纤维横截面积和肌纤维细胞直径。

1.5.6 腓肠肌蛋白总量 移植后2, 4, 6, 8周, 取腓肠肌组织, BCA法测定蛋白量。

2 结果 Results

2.1 基因转染鉴定结果

2.1.1 细胞培养及病毒转染后骨髓间充质干细胞的荧光显微镜观察结果 见图1A, B。

2.1.2 转染的骨髓间充质干细胞进行苏木精-伊红染色 可见细胞呈紫蓝色, 胞浆呈红色, 红细胞呈桔红色, 其他成分呈深浅不同红色(图1C)。

2.1.3 免疫组化检测bFGF表达 镜下可见转染细胞表达bFGF呈阳性, 其表达部位在胞浆, 细胞胞浆染成黄褐色。正常组及阴性组无表达, 见图2。

2.1.4 ELISA检测bFGF含量 bFGF转染后骨髓间充质干细胞胞浆中bFGF含量为8.03 ng/L, 上清液中bFGF含量为5.62 ng/L, 而正常组细胞胞浆中bFGF含量为0.2 ng/L, 上清液为0.18 ng/L, 阴性组细胞胞浆中bFGF含量为0.45 ng/L, 上清液为0.28 ng/L, 见图3。

2.1.5 RT-PCR检测bFGF表达 正常组相对表达量为0.33, 阴性组相对表达量为0.34, bFGF组相对表达量为0.73, bFGF组表达明显高于正常组及阴性组, 见图4。

2.1.6 Western blotting检测bFGF蛋白表达 正常组和阴性组bFGF蛋白相对表达量为0.00, bFGF组相对表达量为0.85, 见图5。

2.1.7 MTT法检测细胞增殖活力 细胞转染后24, 36, 72 h, bFGF表达组吸光度值与阴性组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

2.2 动物实验结果

2.2.1 实验动物数量分析 32只SD大鼠均进入结果分析, 中途无脱落。

2.2.2 实验动物大体观察 造模后对照组和实验组都出现动物嗜睡, 活动减少, 步态不稳, 食欲不佳, 饮水减少的现象。造模第5天, 各组动物饮食饮水逐渐增加并趋于正常。对照组在第7天, 第9天和第10天时分别发现1只动物肢体出现溃疡, 溃疡处并且有撕咬抓挠过的痕迹。实验组无明显异常情况。

表1 MTT检测bFGF表达组与阴性组细胞增殖活力 ($\bar{x} \pm s, A$ 值)
Table 1 Cell proliferation activity in the basic fibroblast growth factor and negative groups detected by MTT method

组别	24 h	36 h	72 h
bFGF表达组	0.020±0.022 ^a	0.200±0.023 ^a	0.240±0.024 ^a
对照组	0.010±0.021	0.130±0.024	0.150±0.026

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子。

2.2.3 骨髓间充质干细胞移植后生长迁移情况 移植后第2, 4, 6, 8周, 取实验组与对照组腓肠肌肌肉组织标本, 制备冰冻切片荧光显微镜观察, 发现实验组腓肠肌标本中带有绿色荧光细胞, 腓肠肌中的标记骨髓间充质干细胞2-8周逐渐减少, 见图6。

2.2.4 腓肠肌肌肉动作电位检测 腓肠肌失去神经支配后, 实验组与对照组手术侧比较正常侧运动电位波形变简单, 时限延长, 实验组与对照组均出现纤颤电位, 纤颤电位在术后4周内一直持续水平较高, 8周后呈进行性下降, 2, 4周时对照组与实验组比较变化不明显, 6, 8周时实验组与对照组差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表2。

表2 各组腓肠肌肌肉动作电位 ($\bar{x} \pm s, n=16, \mu V$)
Table 2 Action potential detection of the gastrocnemius muscle

组别	第2周	第4周	第6周	第8周
实验组	453.83±23.67	377.72±21.32	280.83±22.45 ^a	221.06±23.87 ^a
对照组	340.94±22.32	284.06±24.67	189.28±23.72	113.39±22.13

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.2.5 腓肠肌肌肉质量残存率 骨髓间充质干细胞移植后第4周实验组腓肠肌湿质量残存率与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组明显优于对照组。移植的骨髓间充质干细胞能有效减少失去神经支配肌肉的萎缩速度, 第8周时实验组腓肠肌湿质量残存率与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组明显优于对照组, 见表3。

表3 各组腓肠肌残余肌肉湿质量残存率 ($\bar{x} \pm s, n=4$)
Table 3 Residual rate of wet weight of the gastrocnemius muscle

组别	第2周	第4周	第6周	第8周
实验组	1.85±0.01 ^a	1.57±0.01 ^a	0.96±0.01 ^a	0.80±0.01 ^a
对照组	1.10±0.04	0.82±0.02	0.59±0.04	0.37±0.01

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.2.6 腓肠肌横截面积及细胞直径 骨髓间充质干细胞移植后第4周实验组腓肠肌横截面积及细胞直径与对照组

比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组明显优于对照组。移植的骨髓间充质干细胞能有效延缓失神经肌肉萎缩的速度, 第8周时实验组腓肠肌横截面积及细胞直径与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组明显优于对照组, 见表4, 5。

表4 各组腓肠肌纤维横截面积 ($\bar{x} \pm s, n=4, \mu m^2 \times 200$)
Table 4 Cross-sectional area of gastrocnemius muscle fibers

组别	第2周	第4周	第6周	第8周
实验组	1 864.64±31.56 ^a	1 942.82±34.32 ^a	840.43±36.21 ^a	615.92±35.33 ^a
对照组	1 021.46±23.21	785.64±23.78	475.41±22.65	332.72±24.11

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表5 各组腓肠肌纤维细胞直径 ($\bar{x} \pm s, n=4, \mu m \times 200$)
Table 5 Gastrocnemius muscle cell diameter

组别	第2周	第4周	第6周	第8周
实验组	55.86±8.23 ^a	53.68±9.44 ^a	37.40±8.67 ^a	31.57±9.10 ^a
对照组	33.12±7.56	31.89±8.23	23.33±8.86	18.22±7.89

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.2.7 腓肠肌蛋白定量分析 骨髓间充质干细胞移植后第4周实验组腓肠肌蛋白总量与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组明显优于对照组。第8周时实验组腓肠肌蛋白总量与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组明显优于对照组, 见表6。

表6 各组腓肠肌残余肌肉蛋白总量 ($\bar{x} \pm s, n=4, \mu g$)
Table 6 Quantitative analysis of residual gastrocnemius muscle protein

组别	第2周	第4周	第6周	第8周
实验组	4 120.8±55.7 ^a	3 834.7±58.3 ^a	3 470.8±57.5 ^a	2 943.0±56.9 ^a
对照组	2 331.9±55.3	1 868.1±55.7	1 615.3±56.7	1 326.39±57.1

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

外周神经损伤后, 由于神经元对肌细胞的营养作用中断, 导致肌肉萎缩, 运动终板消失, 玻璃样变。这种病理改变随着时间推移逐渐加重, 而且不可逆转^[4-5]。在临床上常采用肢体被动运动、电磁刺激、针灸和药物治疗等方法, 通过改善局部的血液循环来预防和治疗失神经肌萎缩。虽然在动物实验中取得了一定疗效, 但临床疗效也是有限的。周围神经损伤后, 骨骼肌失神经支配萎缩, 故神经长入前防止失神经肌肉萎缩尤为重要。随着对神经营养因子了解的不断深入, 出现了用各种营养因子通过局部或全身注射的方法来预防和治疗失神经后肌萎缩的报道^[6-7]。

骨髓间充质干细胞是骨髓基质系统中的一类多能干细胞, 具有向多种中胚层和神经外胚层来源组织细胞分化的能力, 具有强大的异质性及可塑性, 且易于体外培养扩增及外源基因的转染和表达, 移植排斥反应较弱, 是细胞工程和基因工程的理想载体细胞。它不仅可以携带目的基因, 而且还可以发挥细胞替代和细胞本身的特殊作用^[8-9]。

bFGF是成纤维细胞生长因子家族的基本成员,在多种细胞的增殖、迁移、分化和生存中起到重要的支持作用^[10],也是一种强大的毛细血管增殖刺激剂,能为骨髓间充质干细胞生长提供充足的血供和营养^[11-12]。外源性骨髓间充质干细胞半衰期短,需反复大剂量使用,且价格亦较昂贵。实验通过bFGF基因转染骨髓间充质干细胞,局部注射于失神经肌肉萎缩部位,持续释放的细胞因子促进肌肉再生,同时骨髓间充质干细胞本身也能通过微环境的作用转化为骨骼肌细胞,进而减缓失神经萎缩的速度。

慢病毒载体能感染分裂期及非分裂期细胞,能使目的基因整合至靶细胞基因组从而实现长期表达,转移的基因片段容量大,可向同一细胞引入多种不同的基因,或对同一细胞反复感染,不易诱发宿主免疫反应,其生物学安全性也得以大幅提高。实验采用病毒转染的方法相对简单,随着细胞的传代,目的基因能稳定的遗传给下一代。选用bFGF基因,通过病毒转染的方法^[13-15],转入培养的骨髓间充质干细胞中。实验结果发现,通过病毒转染的方法,可获得抗性转染细胞克隆,细胞在形态上与转染前无明显差别。免疫组化染色结果表明,转染细胞表达bFGF呈阳性,其表达部位在胞浆。而Western blot分析4个转染细胞提取物样本均出现特异性条带,与bFGF相对分子质量相符,而正常组及阴性组样本无此特异性条带出现,可以确定bFGF病毒转染入骨髓间充质干细胞后,的确能在骨髓间充质干细胞中得到正确而高效的表达。转染骨髓间充质干细胞植入体内2, 4, 6, 8周,随时间延长,实验组及对照组都出现肌肉湿质量下降,肌横截面积、肌细胞直径及蛋白残存总量下降及减少。实验组肌纤维萎缩程度较对照组轻,肌肉的肌纤维截面积和直径较对照组大。实验组在相同取材时间点即2, 4, 6, 8周时比较差异有显著性意义($P < 0.05$),实验结果显示,肌肉失去神经支配后,肌肉萎缩的发生不可避免,切实可行的方案为争取延缓肌肉萎缩的发生时间,减慢其发展过程。将转染的细胞植入大鼠失神经的肌肉体内,通过大体观察、腓肠肌肌肉湿质量残存率、腓肠肌横截面积及肌细胞直径、残存腓肠肌动作电位检测等指标检测,可减缓肌肉萎缩速度,但是如何提高作用时间,如何协同其他各种较好的减轻肌肉萎缩的方法,仍需进一步研究。

作者贡献: 实验设计为王彦生,实验实施为于宁,实验评估为王彦生,资料收集为齐常萍。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经沈阳医学院附属中心医院学术委员会伦理委员会审核批准,实验动物在麻醉下进行所有手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 赵志英,胡海涛,冯改丰,等.人脑源性神经营养因子基因修饰神经干细胞移植对痴呆大鼠学习记忆的改善[J].中国修复重建外科杂志,2005,19(5):331-334.
- [2] 王岩峰,吕刚,李雷,等.神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后胶质细胞源性神经营养因子与生长相关蛋白43基因表达的影响[J].中国修复重建外科杂志,2005,19(6):416-419.
- [3] Zhu J, Zhou L, XingWu F. Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. N Engl J Med. 2006;355(22): 2376-2378.
- [4] Martin A, David V, Vico L, et al. Impaired energetic metabolism after central leptin signaling leads to massive appendicular bone loss in hindlimb-suspended rats. J Bone Miner Res. 2008;23(12):2040-2047.
- [5] Widrick JJ, Maddalozzo GF, Hu H, et al. Detrimental effects of reloading recovery on force, shortening velocity, and power of soleus muscles from hindlimb-unloaded rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;295(5):R1585-1592.
- [6] Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. Biochem Biophys Res Commun. 2001;288(2):413-419.
- [7] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006;24(2):462-471.
- [8] Li ZY, Liu L, Tian WD, et al. A study on transfecting green fluorescent protein gene to rat bone marrow mesenchymal stem cells. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2005;40(2): 150-153.
- [9] McMahon JM, Conroy S, Lyons M, et al. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. Stem Cells Dev. 2006;15(1):87-96.
- [10] Lanzetta M, Gal A, Wright B, et al. Effect of FK506 and basic fibroblast growth factor on nerve regeneration using a polytetrafluoroethylene chamber for nerve repair. Int Surg. 2003;88(1):47-51.
- [11] Yanada S, Ochi M, Kojima K, et al. Possibility of selection of chondrogenic progenitor cells by telomere length in FGF-2-expanded mesenchymal stromal cells. Cell Prolif. 2006;39(6):575-584.
- [12] 吴维,胡何节,邓福生,等.血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子体外联合诱导外周血单个核细胞定向分化为血管内皮细胞[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(11):2094-2097.
- [13] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. Mol Biotechnol. 2007;36(3):184-204.
- [14] Xu H, Zhu Y, Xin C. An experimental study on effect of implanting bFGF into denervated skeletal muscle to muscle satellite cell proliferation and muscle atrophy. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2008;22(12):1462-1465.
- [15] Jiang J, Yao P, Gu Y, et al. Adult rat mesenchymal stem cells delay denervated muscle atrophy. Cell Mol Neurobiol. 2012; 32(8):1287-1298.