

- 统的建立[J]. 口腔颌面外科杂志, 2000, 10(4): 288.
- [3] 杨斌, 黄洪章, 张涤生. 颅面三维影像测量分析研究. I. 方法与原理[J]. 口腔颌面外科杂志, 2000, 10(2): 100.
- [4] Marchac D. 颅狭症的颅面部手术治疗[M]. 姚德成(译). 北京

人民卫生出版社, 1984: 1-5.

- [5] 于晓惠. 正常北京人颅面结构的后前位 X 线头影测量研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1990, 25(1): 38.

(编辑 刘清海)

## 骨髓基质细胞成年大鼠脑内移植

郑佳坤<sup>1</sup>, 杨立业<sup>1</sup>, 林小聪<sup>1</sup>, 惠国桢<sup>2</sup>

(1. 潮州市中心医院神经外科, 广东 潮州 521021; 2. 苏州大学附属第一医院神经外科, 江苏 苏州 215007)

**摘要:**【目的】研究骨髓基质细胞脑内移植后的分布和移行, 为细胞移植治疗疾病奠定基础。【方法】常规培养大鼠骨髓基质细胞, 应用免疫组织化学方法对细胞进行鉴定, Hoechst33258 标记细胞, 立体定向移植到大鼠的纹状体, 经过一段时间后处死大鼠, 脑组织切片, 直接在荧光显微镜下检查存活的细胞。【结果】细胞移植到大鼠脑内能够长时间存活, 移植细胞与宿主细胞有很好的相容性, 宿主脑组织的结构无破坏, 移植细胞能够移行一段距离, 说明脑内存在的信号诱导细胞向一定的方向迁徙。【结论】骨髓基质细胞脑内移植后, 能够与宿主脑组织整合在一起, 无细胞过度增生和胶质瘢痕形成, 这种细胞可能成为中枢神经系统自体移植的细胞来源。

**关键词:** 骨髓基质细胞; 培养; 移植

中图分类号: Q831 文献标识码: A 文章编号: 1000-257(2002)5S-0017-03

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是指克隆形成单位成纤维细胞(colony-forming-unit fibroblast)又称间充质干细胞(mesenchymal stem cell), BMSCs 是骨、软骨和脂肪的组织来源, 在一定的条件下可诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌母细胞<sup>[1, 2]</sup>。近几年的研究表明, BMSCs 在体内和体外都可以表达神经元的标志物, 提示 BMSCs 有分化为神经细胞的潜能<sup>[3-8]</sup>。BMSCs 对自体神经移植有潜在的应用前景, 我们在体内对其进行移植研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)和谷氨酰胺均为 GIBCO/BRL 公司产品; 重组人碱性成纤维细胞生长因子(Sigma, F0291); 鼠抗波形蛋白单克隆抗体(1:150, Chemicon); 鼠抗神经元特异性烯醇化酶(NSE)单克隆抗体(1:100, Antibody Diagnostic, CA); 鼠抗神经微丝(NF)单克隆抗体(1:100, Antibody Diagnostic, CA); 鼠抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体(1:100, Antibody Diagnostic, CA); 鼠抗纤维粘连蛋白单克隆抗体(1:200, Chemicon); FITC 标记的兔抗鼠二抗(1:100, Chemicon); ABC 试剂盒为华美公司产品。

#### 1.2 骨髓基质细胞的培养

SD 大鼠(鼠龄 2~4 个月)过量麻醉处死, 取出股骨和胫骨, 无菌条件下剪开骨髓腔, 用缓冲液冲洗出骨髓组织, 2.5 mL 注射器反复抽吸冲出的细胞使其分离, 200×g 离心 10 min, 去上清, DMEM 培养基重悬细胞, 培养基中含有体积分数 10% 的胎牛血清, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 100 U/mL 的青霉素, 100 g/L 的链霉素。细胞的种植数密度约为 8 000 cm<sup>-2</sup>, 24 h 后换培液, 此时贴壁的细胞较少, 细胞生长至融合时传代; 用 2.5 g/L 的胰蛋白酶 1 mmol/L EDTA 37 °C 消

化细胞 3~4 min, 离心, 细胞稀释 2~3 倍传至培养瓶中培养, 2~3 d 换半量培养液。传代培养的细胞培养基中可加入 bFGF, 使其终质量浓度为 20 μg/L, 这样能明显增加细胞的增殖速度。

#### 1.3 免疫细胞化学检查

贴壁培养的细胞直接在培养皿上, 经过一段时间的培养后进行免疫细胞化学检查。0.01 mol/L PBS 洗去培养液, 40 g/L 的多聚甲醛固定 15 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 2.5 g/L Triton X-100 处理 15 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 含有体积分数 1% 马血清的一抗 37 °C 处理 1.5 h, 4 °C 过夜; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; FITC 结合的兔抗鼠 IgG 二抗 37 °C 孵育 1 h; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 荧光染色在荧光显微镜下观察、照相。

#### 1.4 细胞标记和纹状体内移植

移植前, 培养基中加入 1 mg/L 的 Hoechst33258 标记 24 h, 2.5 g/L 的胰蛋白酶 1 mmol/L EDTA 消化, 离心收集细胞, 将细胞数密度调至 (0.5~1)×10<sup>9</sup>/L 待移植用。SD 大鼠体重 220~240 g, 按 350 mg/kg 腹腔内注入水合氯醛, 麻醉满意后, 将大鼠固定在立体定向架(Narishige)上, 头部常规备皮消毒, 无菌操作下头皮切口、钻孔, 纹状体立体定向位点是前囟前方 1 mm, 侧方 3 mm, 进针深度为 4~5 mm, 将 4 μL 细胞悬液匀速注入此位点, 注射时间为 5 min, 停留时间 5 min。退针后双氧水消毒, 缝合切口。

#### 1.5 脑组织的处理和观察

移植后 1 个月(5 只)、2 个月(4 只)、3 个月(5 只), 将大鼠过量麻醉处死, 先后用冷的生理盐水和 40 g/L 多聚甲醛灌注固定, -70 °C 冰箱保存。冰冻连续切片(横断, 与针道平行), 厚度为 20 μm。切片直接在荧光显微镜下观察、照相。细胞移行的距离的计算用公式  $N-D/2$  计算, 其中  $N$  为含有移植细胞的切片总厚度,  $D$  为微量进样器的直径, 本

收稿日期: 2002-05-26

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(012452)

作者简介: 郑佳坤(1953-), 男, 广东潮州人, 副主任医师。

实验的微量进样器的直径是 0.75 mm。

## 2 结果

原代培养的细胞仅有少量贴壁, 24 h 后倒掉悬浮的细胞。贴壁细胞在低数密度的状态下长成大的扁平的单层细胞, 一般在 7~10 d 后达到融合, 这时细胞体变得细长, 形态极像成纤维细胞(图 1)。在胎牛血清存在的条件下, 传代细胞在 3~4 d 左右可增殖一倍, 加入 bFGF 可明显增进细胞的分裂能力。培养的细胞可以稳定增殖和传代, 体外培养 10 代以后, 细胞的增殖速度无明显减慢。细胞表达中胚层来源细胞的标志物波形蛋白(图 2), 大部分细胞也表达纤维粘连蛋白和 NSE, 但 NSE 的阳性较弱, 未见 NF 和 GFAP 的表达。

Hoechst33258 处理 24 h 后, 全部细胞的细胞核都被标记。BMSCs 移植到大鼠纹状体 1 到 3 个月, 处死大鼠, 对脑组织进行冰冻切片检查。在荧光显微镜下所有的移植动物脑组织中都发现了移植的存活细胞, 移植后 1 个月, 存活的细胞主要位于针道内, 部分细胞开始移行, 与宿主组织结合在一起。移植后 2 个月, 细胞的移行更加明显(图 3), 最远可达皮层下部位, 大部分细胞集中在纹状体和胼胝体, 移行到皮质的细胞较少。移植后 3 个月, 脑内存活的移植细胞明显减少, 但移行得更加广泛, 移行最远距离可距针道边缘 1 mm。

## 3 讨论

现已明确胎脑移植治疗帕金森病在临床上是有效的; 移植的胎儿中脑腹侧细胞在病人体内存活, 持续分泌多巴胺, 病人的症状改善, 并且有形态学证据的支持<sup>[9]</sup>。但这种治疗方案难以大范围地开展, 原因是供体有限, 而且还涉及伦理和道德的争议。解决的一个办法是异种移植, 但由于异种免疫排斥的原因, 这种办法短期内难以应用到临床。另一个解决问题的途径是将人体细胞在体外大量培养, 分化成所需的神经细胞, 再移植到病人体内, 这就解决了细胞来源的问题。但中枢神经细胞位置深在, 获取细胞必然对组织造成损伤。而人体的其他组织如骨髓、皮肤和脂肪组织则容易获取, 如果在体外将这些来源的细胞分化为神经细胞或能直接移植到病人体内, 将为临床移植大规模的开展提供极大的便利。

最近有研究证实, 骨髓来源的细胞可以在体内表现为神经元的表型, 表达神经元特异性核抗体(neuron-specific nuclear antigen, NeuN)和 NSE<sup>[3,4]</sup>, 两者用的移植细胞是没有经过任何处理的骨髓细胞的混合物, 因此不可能把移植细胞的命运归于一种干细胞类型。目前认为, 体内鉴定神经元最可靠的方法还是细胞的形态, 脑内移植分化的 NSE 和 NeuN 阳性细胞无典型的成熟的神经元形态<sup>[3,4]</sup>。BMSCs 移植到新生小鼠的侧脑室后, 移植细胞广泛移行到宿主前脑和小脑, 对宿主的脑组织结构无破坏, 有很好的相容性, 在海马和纹状体的移植细胞表达星型胶质细胞的标志物 GFAP, 在脑中偶尔见到 NF 阳性的植入细胞, 说明部分 BMSCs 分化为神经元<sup>[9]</sup>。

最近对 BMSCs 进行体外分化研究, 有少量的细胞分化为神经元和星型胶质细胞, 在分化过程中有巢蛋白的 mRNA

表达<sup>[8]</sup>。将人或小鼠的 BMSCs 标记后与胚胎大鼠中脑或纹状体细胞共培养, 有少量的 BMSCs 分化为神经元样细胞, 表达 NeuN, 一部分分化为胶质细胞, 表达 GFAP<sup>[8]</sup>。Woodbury 等<sup>[7]</sup>应用  $\beta$ -巯基乙醇进行分化研究, 约 50%~80% 的细胞化为神经元样的细胞, 表达 NSE 和 NF。我们的免疫细胞化学检查证实, BMSCs 有 NSE 的表达, 初步的研究也证实 BMSCs 中有 NSE mRNA 的表达(待发表资料), 这都进一步提示 BMSCs 向神经细胞分化的能力, 表明了这种细胞极强的可塑性。移植到成年大鼠脑内, 细胞可以移行, 证明脑内存在一定的信号诱导外源性的 BMSCs 向一定的方向移行和分化。BMSCs 在体内究竟分化为神经细胞还是维持骨髓基质细胞的表型, 目前还在研究之中。Chen 等<sup>[10]</sup>将骨髓细胞与脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)一起注入到短暂缺血大鼠的脑内缺血部位的边缘区, 移植后一周检查大鼠的运动功能与对照相比有明显改善, 在移植部位发现移植的细胞, 部分移植细胞表达 NeuN 和 GFAP, 证明骨髓来源的细胞可以分化为神经元和星型胶质细胞。但这种神经细胞究竟是造血干细胞还是骨髓基质细胞来源, 尚有待于确证。

骨髓基质细胞能在体内和体外分化为神经细胞, 因此对治疗中枢神经系统疾病有潜在的应用价值, 与其它的干细胞相比有显著的优越性, 首先, 骨髓细胞容易获得, 可以避免从脑部获取细胞所造成的损伤; 其次, 这种细胞在体外增殖速度快, 不必进行永生就能获得足够的细胞用于移植; 第三, BMSCs 能够进行自体移植, 可以克服种族和免疫障碍; 如果在体外证实这种细胞有功能, 能分泌神经递质, 将来就可进行动物实验, BMSCs 可以做为一种潜在的自体神经移植的一种细胞来源。

(本文图 1~3 见封 3)

### 参考文献:

- [1] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 71.
- [2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143.
- [3] Brazelton T R, Rossi F M V, Keshet G I, *et al.* From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1775.
- [4] Mezey E, Chandross K J, Harta G, *et al.* Taming blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow[J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1779.
- [5] Kopen G C, Prockop D J, Pinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(19): 10711.
- [6] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, *et al.* Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(4): 364.
- [7] Deng W, Obrocka M, Fischer I, *et al.* *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(1): 148.

- [8] Sanchez-Ramos J, Song S, Carlozo-Pelaez F, *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro* [J]. *Exp Neurol*. 2000, 164(2): 247.
- [9] Freed C R, Greene P E, Breeze R E, *et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease [J]. *N Engl J Med*. 2001, 344(10): 710.
- [10] Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat [J]. *Neuropharmacology*, 2000, 39(5): 711.

(编辑 张敏瑞)

## 5-氟尿嘧啶-聚[(2-羟乙基)-L-谷酰胺]的合成及释药研究

张静夏, 潘仕荣, 王琴梅, 冯敏, 吴伟荣

(中山大学附属第一医院人工心研究室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】将小分子的抗癌药 5-氟尿嘧啶键合在具有水溶性良好、可生物降解的高分子材料上, 得到低毒、良好生物相容性和缓释作用的高分子前药。【方法】以聚谷氨酸苄酯为原料, 用乙醇胺进行胺解得水溶性的、可生物降解的聚[(2-羟乙基)-L-谷酰胺]; 用光气/甲苯液化 5-氟尿嘧啶, 将其以共价键形式键合在高分子上, 得 5-氟尿嘧啶的高分子前药。【结果】用红外光谱、紫外光谱、核磁共振谱及差热分析对其结构进行表征, 用紫外光谱测定其药物含量, 载药高分子的接药率约为 38.4%, 在磷酸盐介质(pH=7.2)中 24 h 和 6 周药物累积释放量分别占总载药量的 27.26% 和 57.53%。【结论】5-氟尿嘧啶以碳酸酯形式键合在聚[(2-羟乙基)-L-谷酰胺]之上, 体外释药实验表现出一定的缓释效果。

关键词: 聚[(2-羟乙基)-L-谷酰胺]; 5-氟尿嘧啶-聚[(2-羟乙基)-L-谷酰胺]; 高分子前药; 缓释

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0019-03

目前临床上治疗癌症的药物通常为小分子的药物, 其特点是除杀死癌细胞外, 对正常的细胞也有较大的毒副作用, 此外还具有代谢快、半衰期短等缺点。而将小分子抗癌药物键合在高分子材料上制成高分子前药可具备缓释、靶向等特点, 可有效克服小分子药物的一些缺点。聚氨基酸类合成高分子材料对生物体无毒, 无副作用, 无免疫源性, 具有良好的生物相容性。因此聚氨基酸类作为高分子键合药物的载体研究倍受人们的关注<sup>[1~4]</sup>。聚谷氨酸苄酯具有良好的生物相容性和生物可降解性, 但水溶性极差, 反应活性也不高, 不宜直接作为高分子键合药物的载体。本文以聚谷氨酸苄酯为原料, 用乙醇胺进行胺解得水溶性良好、反应活性较高的聚[(2-羟乙基)-L-谷酰胺] (PHEG), 将抗癌药 5-氟尿嘧啶以共价键形式键合其上得高分子前药, 合成路线如下。并对其进行了紫外光谱、红外光谱、核磁共振谱和差热分析其表征。

加钠回馏 8 h, 蒸出; 吡啶: 氢氧化钠干燥, 蒸出; *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF): 4A 分子筛干燥, 减压蒸馏。透析袋:  $\Phi=1$  cm, 透析相对分子质量范围: 10 000;  $\Phi=2.5$  cm, 透析相对分子质量范围: 8000~1200(北京)。

### 1.2 聚[(2-羟乙基)-L-谷酰胺] (PHEG)的合成

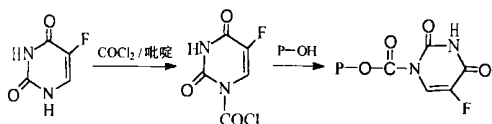
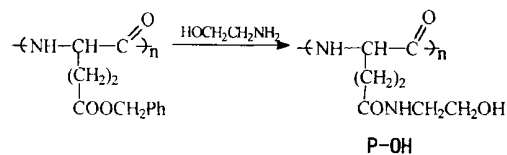
在反应瓶中加入 5 g PBLG, 10 mL 精制的二氧六环和 40 mL 乙醇胺, 60 °C 下电磁搅拌约 16 h 溶液透明, 继续搅拌 2~3 h, 取少量反应液用水稀释, 如无沉淀, 则再取少量将反应液倒入 5 倍体积的三氯甲烷沉淀, 抽滤, 沉淀溶解在适量水中, 测定紫外光谱, 若在 257 nm 处观察不到苄基的吸收峰, 将反应液倒入 5 倍体积的三氯甲烷中沉淀, 抽滤, 沉淀用三氯甲烷洗涤数次, 真空干燥得白色固体。用  $\Phi=2.5$  cm 的透析袋在蒸馏水中透析 48 h, 真空干燥得无色透亮固体 2.3 g, 产率为 58%。称量 30 mg PHEG 溶于 15 mL 蒸馏水中, 使用乌氏黏度计, 测定其黏度,  $[\eta]=1.4 \times 10^{-5} \times m^{0.9}$  (H<sub>2</sub>O), PHEG 的相对分子质量为  $3.3 \times 10^4$ 。

### 1.3 5-氟尿嘧啶-聚[(2-羟乙基)-L-谷酰胺] (5-FU-PHEG)的合成

在反应瓶中加入 0.5 g 5-氟尿嘧啶和 10 mL 吡啶, 注入 5 mL 5 mol/L 的光气-甲苯液, 冰浴下反应 1 h, 撤去冰浴反应 1 h, 抽去多余的吡啶; 将 0.5 g PHEG 溶于 50 mL DMF 中, 慢慢加入反应液中, 15 °C 下反应 40 h, 用 5 倍的三氯甲烷沉淀, 抽滤, 沉淀用三氯甲烷和乙醚分别洗涤数次, 真空干燥得黄色固体。

### 1.4 5-FU-PHEG中的接药率测定

精确称量 5-氟尿嘧啶 10 mg, 用 0.1 mol/L HCl 溶解并稀释至 100 mL 作为母液, 用移液管准确移取母液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4 mL 稀释至 25 mL, 用紫外光谱测



## 1 材料与方

### 1.1 材

聚谷氨酸苄酯(PBLG): 自制; 光气-甲苯液: 自制; 乙醇胺: 广州试剂厂; 5-氟尿嘧啶: 上海第十二制药厂; 二氧六环:

收稿日期: 2002-06-09

作者简介: 张静夏(1965-), 女, 河南修武人, 博士, 讲师

骨髓基质细胞成率大鼠脑内移植 (正文见第 17 页)

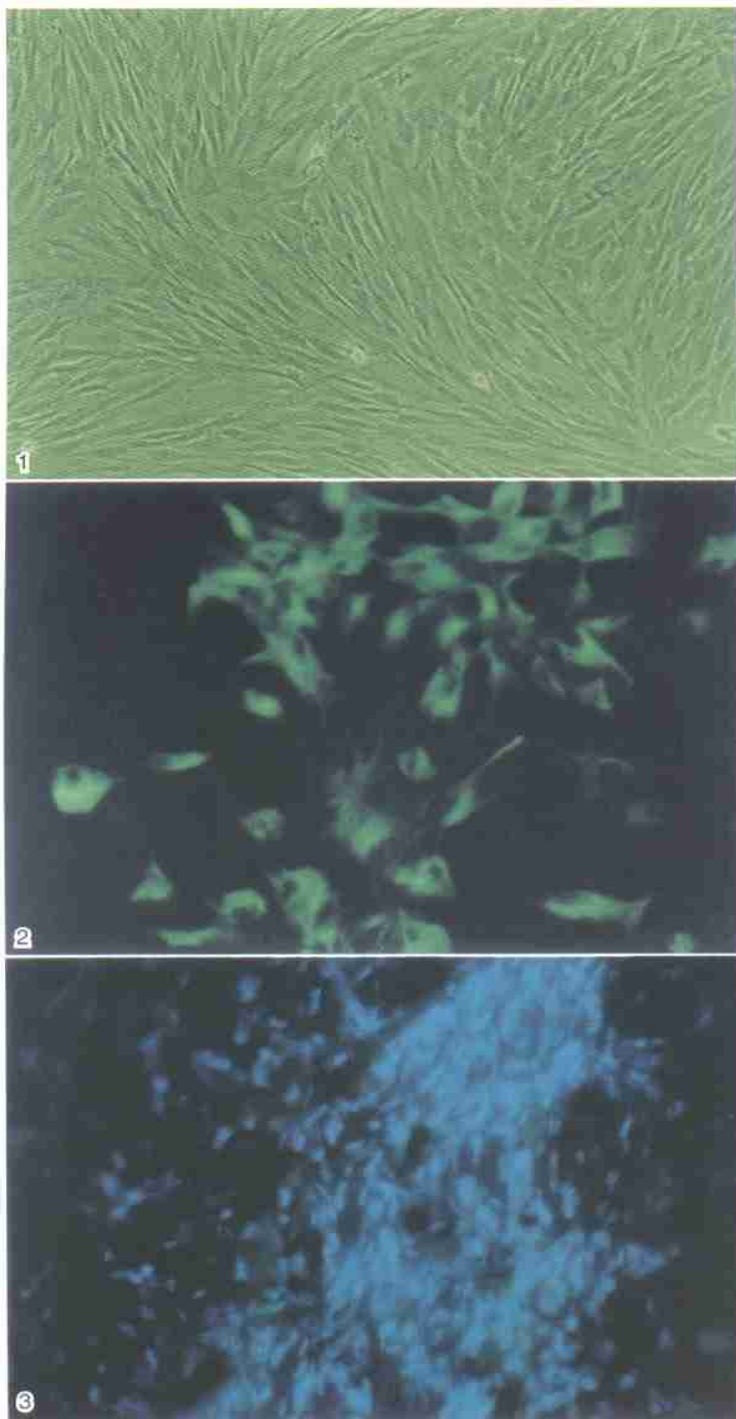


图 1 高密度状态下 BMSCs 的形态(100 ×)  
图 2 BMSCs 的鉴定(100 ×)  
图 3 BMSCs 移植到大鼠脑内的形态(100 ×)