

# The Change of the PECAM and Caspase-6 in Cerebrospinal Fluid of Cerebral Infarction (CI) Patients Treated with Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells

Na Li<sup>1</sup>, Huipeng Meng<sup>2</sup>, Huajiang Dong<sup>2</sup>, Ping Wang<sup>2</sup>, Jian Xu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Baoding Hospital, Peking Children's Hospital, Baoding Hebei

<sup>2</sup>School of Precision Instrument and Optoelectronic Engineering, Tianjin University, Tianjin

<sup>3</sup>Logistics University of CAPF, Tianjin

Email: \*xuj7910@163.com

Received: Nov. 29<sup>th</sup>, 2019; accepted: Dec. 13<sup>th</sup>, 2019; published: Dec. 23<sup>rd</sup>, 2019

---

## Abstract

**Objective:** To investigate the effect of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) on immune microenvironment and angiogenesis reconstruction of cerebral infarction (CI). **Methods:** 36 cases of cerebrospinal fluid were divided into 2 groups, including control group and CI + UC-MSCs treatment group 18 cases in each group. PECAM and caspase-6 in cerebrospinal fluid were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISSA) in each group. **Results:** PECAM expression in the cell treatment group was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), while caspase-6 expression in the cell treatment group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and the hospital stay and prognosis scores of the UC-MSCs group were better than those of the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The main possible mechanism of UC-MSCs for treatment of CI was regulating stabilization of immune microenvironment and improving angiogenesis reconstruction in damaged brain tissue. Sequential treatment with mesenchymal stem cells of umbilical cord is an effective and safe treatment method for patients with craniocerebral trauma. UC-MSCs can effectively control inflammation and reduce the hospitalization time and prognosis score of patients.

## Keywords

Umbilical Cord, Mesenchymal Stem Cells, PECAM, Apoptosis

---

\*通讯作者。

# 间充质干细胞治疗脑梗塞后脑脊液中血小板 - 内皮细胞黏附分子及Caspase-6的变化

李娜<sup>1</sup>, 孟慧鹏<sup>2</sup>, 董化江<sup>2</sup>, 王平<sup>2</sup>, 徐健<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>北京儿童医院保定医院五官科, 河北 保定

<sup>2</sup>天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津

<sup>3</sup>武警后勤学院, 天津

Email: xuj7910@163.com

收稿日期: 2019年11月29日; 录用日期: 2019年12月13日; 发布日期: 2019年12月23日

## 摘要

**目的:** 探讨脐带华通氏胶源性间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)治疗脑梗塞的效果及对脑脊液内血小板 - 内皮细胞黏附分子(plate endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM)及caspase-3的影响。**方法:** 本研究共纳入颅脑创伤患者36人, 入院时格拉斯哥评分无差异, 随机分为常规治疗组和UC-MSCs治疗组, 每组18人。对比以上两组患者CT或核磁的改变情况; 对比两组患者的入院评分、住院时间和预后评分; 脑脊液标本来源于临床生物样本库。本研究对脑脊液的中血小板 - 内皮细胞黏附分子(PECAM)及caspase-6的采用酶联免疫吸附试方法检测。**结果:** 细胞治疗组患者PECAM的表达高于对照组, 差异显著, 有统计学意义( $P < 0.05$ ), 细胞治疗组患者caspase-6表达低于对照组, 差异显著, 有统计学意义( $P < 0.05$ ); UC-MSCs组住院时间及预后评分均优于对照组( $P < 0.05$ )。**结论:** 颅梗塞患者行常规治疗辅以UC-MSCs治疗既可有效上调PECAM的表达水平, 同时又可有效地降低caspase-6的表达, 对颅脑创伤患者住院时间和预后评分均有不同程度改善。

## 关键词

脐带, 间充质干细行胞, 血小板 - 内皮细胞黏附分子, 凋亡

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

脑梗塞(CI)发病率高, 致死、致残率高, 且预后差, 严重威胁着患者的生活质量, 为经济的进步发展带来了沉重的负担[1] [2] [3]。目前, CI 及其后遗症的治疗手段相对有限, 临床上主要是对症支持治疗以及营养神经治疗, 治疗效果不尽人意, 其主要原因为中枢神经系统损伤后结构难以自我重建, 往往遗留严重的并发症, 如运动障碍、智力缺陷、癫痫等[4]。近年来随着干细胞(stem cell)技术的不断成熟和临床应用掀起了继药物治疗和手术治疗的第三次医学革命[5]。当前, 干细胞研究已成为 21 世纪国际生命科学研究中最具发展潜力的方向之一, 干细胞作为一种具有再生各种组织器官潜能的细胞, 在器官移植、创伤修复、细胞治疗以及组织工程领域前景广泛[2] [6]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一

类具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞, 存在于骨髓、脐血、脐带、全身结缔组织以及器官间质等组织[7]。其中脐带源 MSCs 具有取材容易、来源广、收集简便、免疫豁免、无伦理争议等优势, 广泛应用于临床研究和基础科研[8]。关键间充质干细胞治疗 CI 的研究主要作用机理主要包括细胞替代治疗及细胞副产品参与组织修复两种观点[9]。本文拟探讨 CI 患者经常规治疗并辅以脐带 MSCs 治疗的临床效果及对血小板-内皮细胞黏附分子及凋亡蛋白 caspase-6 的影响, 为 CI 的治疗提供新的思路。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 临床资料及样本信息

本研究共纳入颅脑创伤患者 36 人, 入院时格拉斯哥评分无差异, 随机分为常规治疗组和 UC-MSCs 治疗组, 每组 18 人。脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)样本来源于生物样本库, 取各组脑脊液行蛋白组学分析。入选病例要求: 颅脑创伤外伤史; 头颅计算机断层扫描(computed tomography, CT)确诊; 格拉斯哥昏迷评分(Glasgow Coma Scale, GCS)  $\leq 8$  分, 通过随机数字法分组, 进行不同的治疗方案。

### 2.2. 细胞获取

孕产妇脐带的获取来源于北京儿童医院保定医院, 脐带的采集须经产妇本人及家属同意并签署相关的医疗文书及知情同意书。脐带去外层表皮以及两根动脉一根静脉, 留取华通胶(Wharton jelly, WJ), 将 WJ 剪成体积为  $1 \text{ mm}^3$  的组织块, 加入间充质干细胞专用培养基进行培养, 约一周后陆续有细胞爬出, 待融合度达到 80% 后传代培养, 细胞活力  $\geq 90\%$ , 病原菌排查未检出细菌, 至第 3~5 代时用于本研究。

### 2.3. 仪器与试剂

UltraCULYURETM 无血清培养基(美国 Lonza 公司); PECAM 酶联免疫吸附试剂盒(ELISSA 分析试剂盒)(武汉艾美捷科技有限公司); caspase-3ELISA 试剂盒(瑞典 Mabtech 公司); 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 型号: FBS10099-141)。

### 2.4. 统计学处理

应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. 脐带 MSCs 的鉴定

脐带 MSCs 约一周后可见其在组织块周围爬出, 细胞成梭形, 呈“鱼群状”排列, 待融合度达到 80% 后传代培养并进行细胞鉴定。本研究选用的 marker 为 CD90、CD73、CD105、CD34, 其中 CD90、CD73 均阳性细胞数为 95.5%; CD105 阳性细胞数为 96.2%; CD34 阴性细胞数为 98.1%。

### 3.2. 两组患者入院 GCS 评分及 GOS 评分

两组患者年龄比较无差异( $P > 0.05$ ); 两组患者 GOS 评分比较无差异( $P > 0.05$ ); 细胞治疗组患者 GOS 评分优于对照组, 差异显著, (常规治疗组给与对症支持治疗, 不给予细胞治疗)有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 1。

### 3.3. 两组患者入院一周后 Caspase-6 及 PECAM 差异情况

两组患者年龄比较无差异( $P > 0.05$ ); 细胞治疗组患者 PECAM 表达高于对照组, 差异显著, 有统计

学意义( $P < 0.05$ ), 细胞治疗组患者 **caspase-3** 表达低于对照组, 差异显著, 有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。

**Table 1.** The comparison of age, GCS and GOS in two groups

**表 1.** 实验组和对照组年龄、入院 GCS 评分及 GOS 评分的比较( $\bar{x} \pm s$ )

	细胞治疗组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	48 ± 15.6	47.0 ± 11.4	0.36	0.79
入院 GCS 评分(分)	6.11 ± 1.40	5.58 ± 1.6	0.87	0.50
GOS 评分(分)	4.44 ± 1.04	3.04 ± 1.7	2.04	0.03 <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**Table 2.** The comparison of PECAM, caspase-6 in two groups

**表 2.** 实验组和对照组 PECAM, caspase-6 差异情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

	实验组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	48 ± 15.6	47.0 ± 11.4	0.35	0.76
PECAM (pg/L)	134.25 ± 11.76	39.08 ± 4.00	9.89	0.001 <sup>a</sup>
Caspase-6 (pg/L)	38.70 ± 6.98	102.8 ± 9.88	5.90	0.001 <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

## 4. 讨论

CI 的发病率逐年上升, 传统的治疗措施为手术加神经营养和康复训练相结合, 对患者的康复有一定的治疗作用[1] [2]。而干细胞治疗除运动功能、感觉功能有相当的改善外, 患者汗腺分泌障碍、体位性低血压亦得到缓解, 而这些治疗效果是传统的治疗方法所不能实现的, 因此细胞治疗在神经损伤性疾病的治疗中有着独到的优势[3] [4]。虽然对 CI 的病理机制已较为清楚, 但临床上针对受损神经细胞保护、抑制其病理生理进程的干预效果仍不尽如意, CI 后期大量的患者会伴随不同程度的认知功能障碍或身体残疾, 给家庭、社会和国家带来沉重的负担, 预计未来十年因 CI 后遗症产生的经济负担会越来越重。针对 TBI 后脑保护干预策略的基础和临床研究亟需开展, 有效降低 CI 患者致残率和死亡率、改善患者预后的科学治疗方案有待探索。目前临床上对于 CI 的治疗包括手术治疗、亚低温治疗、对症支持治疗、营养神经的治疗, 但是从目前的临床效果来看仍不尽人意, 因此寻找有效的降低致残率、致死率的方法和手段是亟需探讨和解决的课题[5]。

近年来干细胞技术不断进步, 针对 CI 的干细胞治疗也应运而生, 广大医务工作者和需要救治的 CI 患者寄希望于干细胞治疗。目前针对干细胞治疗 CI 的大规模、多中心的研究相对有限, 多针对某一蛋白、某一信号途径或较多地观察了解患者的临床症状以及疾病的改善程度, 因此较全面的在基因组、蛋白组、代谢组角度进行分析显得尤为重要。MSCs 是近年来再生医学的热点和焦点, 干细胞相关技术持续蓬勃发展为组织工程学中器官的修复、再生开辟了一条崭新的路径[2] [6] [7]。将体外分离、培养的足量活细胞种植于天然的人工合成的支架材料上, 使之植入体内后能形成新的有功能的组织, 来替代和(或)修复缺失或损伤的组织。MSCs 尤其是 UCMSCs、BMMSCs 具备获得容易、易在体外扩增培养、长期传代不改变生物学特征, 且免疫原性低、组织修复能力强, 是较为理想的“种子细胞”, 同时 MSCs 可取自自体, 由自体获得的 MSCs 进行移植时不存在免疫排斥, 使得 MSCs 在临床应用上具有良好的应用前景[8] [9] [10] [11]。学科融合、学科交叉与疾病的诊断治疗有机结合可达到更佳预期诊治效果, 将蛋白组组学技术应用于疾病的诊断可更快更好地为医务工作者进行服务, 有利于实现早诊断、早决策、早干预。

干细胞主要通过以下几个方面发挥神经修复作用[12]: 细胞替代治疗, 即通过干细胞的分化和增殖替代损伤和病变的细胞, 重建神经环路; 分泌作用[13], 即分泌具有生物活性的细胞因子, 这些细胞因子发挥生物学性能对损伤组织的修复发挥治疗作用; 促进血管重建, 保证损伤区域血液供应, 即干细胞可以增殖并替补内皮祖细胞, 间充质干细胞本身就是周细胞的一种, 参与血管的再生和重建, 保证损伤区域有充足的血液供应[14]。

经 MSCs 治疗后 UC-MSCs 组住院时间及预后评分均优于对照组, 患者 CSF 中 PECAM 及 caspase-3 发生显著改变, 结合患者 GOS 评分及患者的住院时间可得出以下结论, 即: 就 CI 患者而言 MSCs 的干预可改善患者预后, 其可能的作用机理为较少细胞凋亡及促进血管再生, 改善机体微环境。

干细胞治疗为医学的进步提出了一个新的理念, 通过干细胞来修复损伤组织, 其对神经系统疾病的治疗水平将得到提升, 干细胞治疗无疑为神经系统疾病的救治尤其是各类疑难杂症的处理打开一扇大门, 我们应抓住契机, 最大限度地发挥干细胞功能。本研究主要探讨经脐带 MSCs 治疗后对颅脑创伤患者后 PECAM 及 caspase-6 的改变情况, 尤其是对血管再生及细胞凋亡的影响, 为 CI 的救治提供新的依据和新的思路。

## 基金项目

国家自然科学基金资助项目(编号: 81801240)。

## 参考文献

- [1] 徐海环, 董化江, 商崇智, 等. 脐带间充质干细胞移植急性脑创伤大鼠损伤区域微血管密度的变化[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(33): 5320-5324.
- [2] 谷涌泉, 韩忠朝, 付小兵. 干细胞临床研究与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [3] Li, G., Yang, Y., Dong, H.J., *et al.* (2018) The Research Progress of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *Turkish Neurosurgery*, **28**, 696-702.
- [4] El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J.F., *et al.* (2014) Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies? *Tissue Engineering Part B: Reviews*, **20**, 523-544. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0664>
- [5] Dong, H.J., Shang, C.Z., Li, G., *et al.* (2017) The Distribution of Transplanted Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Large Blood Vessel of Experimental Design with Traumatic Brain Injury. *Journal of Craniofacial Surgery*, **28**, 1615-1619. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000003563>
- [6] 韩忠朝. 间充质干细胞基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 1-112.
- [7] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., *et al.* (1999) Multi-Lineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, **284**, 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- [8] Mareschi, K., Biasin, E., Piacibello, W., *et al.* (2001) Isolation of Human Mesenchymal Stem Cells: Bone Marrow versus Umbilical Cord Blood. *Hematological*, **86**, 1099 -1100.
- [9] Li, J.P., Wan, D.W. and Song, Q.H. (2015) Transplantation of Erythropoietin Gene Transfected Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Limb Ischemia in Rats. *Genetics and Molecular Research*, **14**, 19005-19015. <https://doi.org/10.4238/2015.December.29.8>
- [10] Caplan, A.L. (1991) Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*, **9**, 641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- [11] Dong, H., Li, G., Shang, C., *et al.* (2018) Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell (UC-MSC) Transplantations for Cerebral Palsy. *American Journal of Translational Research*, **10**, 901-906.
- [12] He, H., Zhao, Z.H., Han, F.S., *et al.* (2016) Overexpression of Protein Kinase C Varepsilon Improves Retention and Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Rat Acute Myocardial Infarction. *Cell Death & Disease*, **7**, e2056. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.417>
- [13] Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., *et al.* (2009) Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice Because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-Inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell*, **5**, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>

- [14] Bundgaard, L., Stensballe, A., Elbæk, K., *et al.* (2018) Mapping of Equine Mesenchymal Stromal Cell Surface Proteomes for Identification of Specific Markers Using Proteomics and Gene Expression Analysis: An *in Vitro* Cross-Sectional Study. *Stem Cell Research & Therapy*, **9**, 288. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1041-8>