

骨髓间充质干细胞治疗脑梗死

吴 江 杨春晓 吴 云 王维治

(哈尔滨医科大学附属第二医院神经科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的: 研究骨髓间充质干细胞(MSC)对大鼠脑缺血再灌注损伤的治疗机制。方法: 20只Wistar大鼠随机分为对照组和MSC治疗组。应用GFP阳性MSC,再灌注1d后经尾静脉注射MSC(1×10^6),对照组则注射PBS。采用线栓法建立脑缺血再灌注模型。术后每天由双盲于试验组的研究人员应用爬杆计分法评定大鼠神经功能。缺血2h再灌注8d取脑组织,用免疫组织化学方法检测脑组织中bFGF的表达。结果: MSC治疗组大鼠的神经功能缺损评分明显低于手术组和对照组($P < 0.05$)。MSC治疗组缺血侧缺血周边区脑组织中观察到GFP阳性与bFGF免疫组化染色阳性细胞。结论: 经尾静脉给予的MSC可促进脑缺血再灌注大鼠的运动功能恢复;bFGF表达升高,可能是MSC脑保护作用机制之一。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 脑缺血再灌注; 碱性成纤维生长因子; 大鼠

中图分类号: R743.3 文献标识码: A

Study on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Cerebral Ischemia- Reperfusion Injury in Rats

WU Jiang, YANG Chun-xiao, WU Yun, WANG Wei-zhi

(Department of Neurology, the Affiliated Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of mesenchymal stem cells (MSCs) treating cerebral Ischemia- reperfusion injury of wistar rats. **Methods:** 20 Wistar rats were randomly divided into control group, MSC- treated group. One day after the reperfusion, 1×10^6 MSC were injected via tail vein and the same dose of the PBS was given to the control group. Cerebral ischemia reperfusion model was established with the suture method. 8 days' reperfusion was given to the rats, after 2 hours of middle cerebral artery occlusion (MCAO), whose cerebral tissues were obtained. The neurological deficits of the rats were evaluated by the blind investigator of the research every day with the modified neurological Severity Score Points. The MSC were detected by Laser Scanning Confocal Microscopy and the basic fibroblast growth factor (bFGF) expression was detected by immuno- histochemistry. **Results:** The score of neurological impairment in the MSC- treated group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), with GFP and bFGF immunochemical stain positive cells around the ischemic brain. **Conclusion:** MSC given via tail vein can promote motor function recovery of cerebral Ischemia reperfusion rat. The increase of expression may be one of the MSC's neuro- protective mechanisms.

Key words: Bone mesenchymal stem cells; Cerebral ischemic- reperfusion; Wistar rats; Basic fibroblast growth factor

骨髓间充质干细胞(MSC)是一种来源于骨髓的,非造血干细胞,具有很强的增殖能力和可能的多向分化潜能。研究证明, MSC在体内、体外可以分化为神经样细胞和神经胶质样细胞。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是最重要的神经营养因子之一,脑缺血再灌注损伤后表达升高,而给予促进内源性或给予外源性bFGF是治疗脑缺血的一种重要的、可行且可靠的方法。通过尾静脉将MSC移植到大鼠脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内,观察脑组织中MSC的分布、bFGF的表达,探讨MSC是否有脑保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 MSC的提取、培养和鉴定方法

1.1.1 骨髓基质细胞的分离、原代和传代培养: 用表达GFP的wistar大鼠用来提供BMSCs。MSCs的分离,吸入麻醉后,拉颈处死大鼠,无菌操作取出双侧股骨、胫骨,用PBS清洗干净,除去股骨近端和胫骨远端,暴露骨髓腔,然后去除另一端骨髓,用18号针在骨端生长面开一个小孔,用注射器将IMDM培养液(Iscove's Modified Dulbecco Medium: IMDM含10%的胎牛

血清、100U/ml PenicillinG、100ug/ml Streptomycin),收集冲洗出来的骨髓。用注射器反复抽吸以打散组织成为细胞悬液,1000转/分离心10分钟。用含10%胎牛血清的IMDM培养液重新悬浮沉淀的细胞,吹散后计数。将稀释后的细胞接种到细胞培养的瓶中,接种密度 1×10^4 个细胞/ cm^2 。于37℃ 5% CO₂及饱和湿度的二氧化碳培养箱内培养,5日后观察细胞生长情况。

1.1.2 MSCs的扩增: MSCs原代接种5日后更换培养液,弃去未贴壁细胞,3日换取一次。细胞培养第6~7日可传代。吸去培养液,PBS冲洗两遍,将贴壁的、接近融合的MSC用含0.01% EDTA的0.25%胰酶室温消化3Min,加入新的培养基,用吸管冲下细胞混匀,按1:2的比例传代。

1.1.3 细胞移植: 缺血再灌注损伤后24小时,实验动物随机分为2组。首先1.5~2.0%异氟烷吸入麻醉,然后对照组($n = 10$)经尾静脉注射PBS 500 μ l;治疗组含BMSCs 1×10^6 + PBS 500 μ l ($n = 10$),治疗后观察4小时。

1.2 实验动物分组和模型制作

体质量为250~300g的雌性健康Wistar大鼠20只,随机分为对照组和MSC治疗组,每组10只;采用线栓法建立大鼠脑中动脉缺血再灌注损伤模型, MSC治疗组和对照组在缺血2h再灌注1d后经颈外动脉注入 1×10^6 MSC悬液或等体积的PBS。于MCAO后8d取脑。模型制作成功的大鼠行为学观察

作者简介: 吴江(1968-),男,副主任医师,从事神经病学医教研工作。

(收稿日期: 2006-04-16 接受日期: 2006-05-12)

采用爬杆记分法进行神经功能缺损评分。术后每天观察、评分。

1.3 标本收集

采用经左心 4℃ 40g/L 多聚甲醛灌注后灌注, 取大鼠嗅球后 6~ 11mm 的脑组织, 制成蜡块, 切片, 每切 7 张取 1 张切片, 共 5 张切片, 进行 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.4 免疫组织化学

严格按照说明书操作, 以 PBS 代替一抗作对照。兔抗大鼠 bFGF 多克隆抗体, 免疫组化染色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司。

1.5 统计学处理

实验结果用 SPSS 10.0 进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

对照组和 MSC 治疗组在脑缺血再灌注 1d 后在爬杆试验中神经功能评分达到高峰, 组间无统计学差异; 再灌注 3d 和 5d MSC 治疗组大鼠神经功能恢复明显好于手术组和对照组,

神经功能评分明显低于对照组 ($P < 0.05$), 5d 后 2 组之间无差异 (见表 1)。

表 1 对照组与治疗组神经功能评分的比较

Table. 1 The score of neurologic function between the control group and MSC treatment group

组别	1d	3d	5d
对照组	17.5±2.2	12.8±2.5	7.7±2.6
MSC 治疗组	16.9±2.4	10.6±2.3*	4.5±2.5*

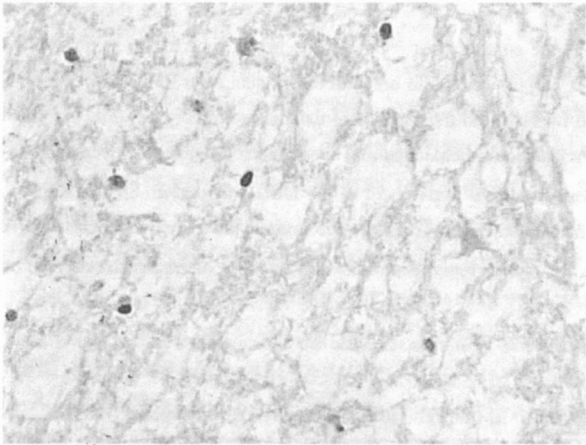
* 与对照组比较 $P < 0.05$
* Compared with the control group, $P < .05$.

2.2 脑组织 HE 染色

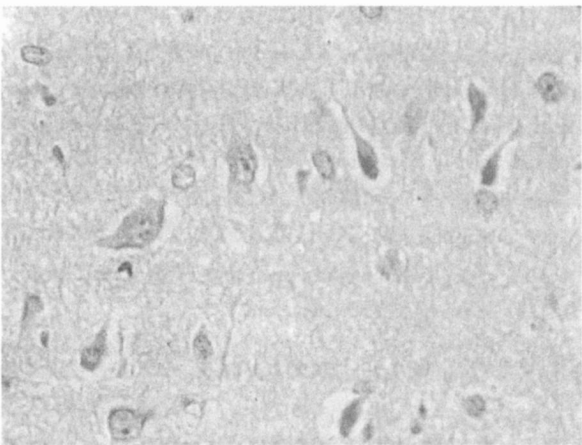
对照组镜下见大量神经细胞变性、坏死, 胞体皱缩, 核固缩, 碎裂, 溶解, 胞浆浓缩红染, 间质水肿明显, 炎症细胞浸润; MSC 治疗组神经细胞变性、坏死数量减少与程度明显减轻 (图 1)。

2.3 免疫组化结果

bFGF 免疫组化: 对照组和 MSC 治疗组均可见到 bFGF 阳性细胞, 免疫阳性细胞主要位于缺血侧大脑皮质和海马等处, 其中 MSC 治疗组 bFGF 阳性细胞明显多于手术组和对照组 (图 2)。

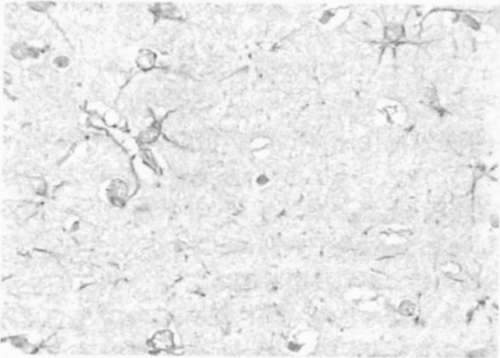


对照组 (HE × 400)
Control group (HE × 400)

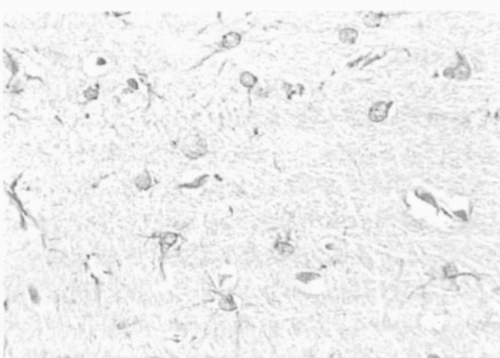


MSC 组 (HE × 400)
MSC group (HE × 400)

附图 1 低倍镜下 (HE × 40): 对照组梗死灶边缘清晰; MSC 治疗组梗死灶边缘模糊, 无明显分界。高倍镜下 (HE × 400): 图片均选自梗死灶中央区, 对照组脑组织变性坏死程度较重, 不见正常神经元, 组织高度水肿, 神经毡崩解; MSC 组脑组织变性坏死程度较轻, 神经元水肿, 可见到固缩神经元, 组织水肿, 神经毡较完整。



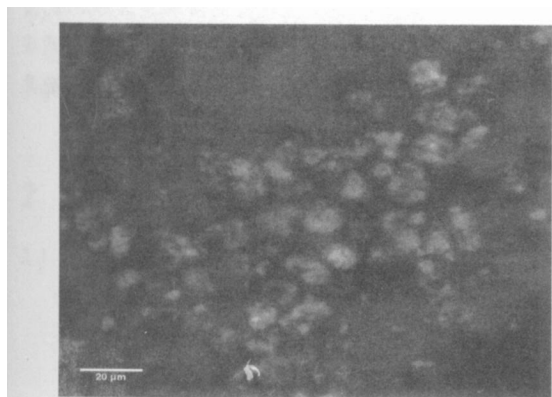
对照组 (× 400)
Control group (× 400)



MSC 治疗组 (× 400)
MSC group (× 400)

2.4 荧光显微镜下, 迁移至缺血侧大脑皮质和海马处的 GFP 阳性的 MSC, 图中比例尺为 20 μ m。

The appearance of GFP positive MSC cells home at the ischemic cortex and hippocampus damaged region under fluorescence microscopy. Scale bar= 20 μ m in picture.



3 讨论

骨髓间充质干细胞(MSC)是骨髓中非造血实质细胞的干细胞, 能够分化成多种细胞。实验证实^[1,2], MSC 可分化为神经元样细胞和胶质样细胞。在本实验中, 我们应用 MSC 经尾静脉移植治疗大鼠脑缺血再灌注损伤, 大鼠的神经功能恢复明显优于对照组, 提示 MSC 具有肯定的神经保护作用, 这为 MSC 治疗缺血性脑血管病提供了证据。

bFGF 是一种具有多种生物活性的神经营养因子, 在大鼠局灶性缺血再灌注损伤中表达明显升高。bFGF 可缩小梗死体积, 促进神经功能恢复^[3]。在本实验中, bFGF 免疫组化单染发现, MSC 移植治疗组脑组织中 bFGF 的表达明显高于对照组。因此, MSC 可通过提高 bFGF 的表达减轻神经功能缺损, 发挥脑保护作用。bFGF 的具体保护机制可能在于以下几点。首先, bFGF 能够促进神经元存活和突起生长, 是神经胶质细胞和血管内皮细胞的促有丝分裂原^[4,5]。

胶质细胞产生并释放各种营养因子, 有助于神经元和其他细胞存活和增殖。内皮细胞分化、毛细血管增生使侧支循环形成, 从而改善局部血供, 促进缺血病灶恢复^[6]。其次, bFGF 可调节血管舒缩状态和局部脑血流量^[7,8]。再次, bFGF 与受体特异性结合后, 激活酪氨酸激酶降低谷氨酸受体蛋白和 Ca²⁺ 结合蛋白等的表达而减少 Ca²⁺ 内流, 拮抗缺氧、兴奋性氨基酸、自由基等的损害而保护神经元^[9]。最后, bFGF 还可阻止迟发性神经细胞死亡和(或)促进新的神经元芽生和突触

形成^[10,11]。国内外的实验证实, 脑缺血再灌注损伤发生时 bFGF 还具有抗凋亡作用。

总之, MSC 作为一种新型的干细胞对大鼠脑缺血再灌注损伤具有切实可靠的保护作用。根据本试验, 我们考虑其脑保护作用与促进神经细胞分泌 bFGF, 进而减少神经细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. 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: 10711-10716
- [2] Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. *Exp Neurol*, 2000, 164: 247-256
- [3] Martinez G, Di Giacomo C, Sorrenti V, et al. Fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor- β immunostaining in rat brain after cerebral postischemic reperfusion[J]. *J Neurosci Res*, 2001, 63: 136-142
- [4] Eckenstein FP. Fibroblast growth factors in the neuron system[J]. *J Neurobiol*, 1994, 25: 1467-1480
- [5] Powell PP, Finklestein SP, Dionne CA, et al. Temporal, differential and regional expression of mRNA for basic fibroblast growth factor in the developing and adult rat brain[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1991, 11: 71-77
- [6] Huang Z, Chen K, Huang PL, et al. bFGF ameliorates focal ischemic injury by blood flow-independent mechanisms in eNOS mutant mice[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272: H1401-H1405
- [7] Tanaka R, Miyasaka Y, Yada K, et al. Basic fibroblast growth factor increases regional cerebral blood flow and reduces infarct size after experimental ischemia in a rat model[J]. *Stroke*, 1995, 26: 2154-2158
- [8] Rosenblatt S, Irikura K, Caday CG, et al. Basic fibroblast growth factor dilates rat pial arterioles[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, 14: 70-74
- [9] Mattson MP, Cheng B. Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis[J]. *Stroke*, 1993, 24(12 suppl): 1136-1140
- [10] Yamada K, Kinoshita A, Kohmura E, et al. Basic fibroblast growth factor prevents thalamic degeneration after cortical infarction[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1991, 11: 472-478
- [11] Kawamata T, Yamaguchi T, Shin-ya K, et al. Time courses of increased expression of signaling transduction molecules induced by basic fibroblast growth factor in PC12 cells[J]. *Neurol Res*, 2001, 23: 327-330

(上接第 23 页)

参考文献

- [1] 李基文. 21 世纪纳米技术在医学应用中的展望[J]. *中国公共卫生*, 2001, 17(8): 717-718
- [2] 张立德, 季季美. 纳米材料和纳米结构[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 3, 46, 72, 112-160
- [3] 赵强, 庞小峰, 胡云霞. 磁性纳米生物材料研究及其用[J]. *原子与分子物理学报*, 2005, 22(2): 222-5
- [4] 沈鹤柏, 汪学友, 杨海峰, 等. DNA 在磁性纳米粒子表面的键合及

表面增强拉曼光谱研究[J]. *科学通报*, 48(21): 2252-6

- [5] 欧阳高亮, 李祺福. 细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗[J]. *国外医学肿瘤分册*, 2000, 27(5): 266-268
- [6] Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, 1972, 26: 2392243
- [7] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 第一版. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 137