

骨髓间质干细胞移植治疗大鼠脑出血模型的实验研究

戴 杰 陈 蓝 黄志东 黄怀宇

(南通大学第二附属医院, 南通市第一人民医院神经内科 江苏 南通 226001)

摘要 目的:研究大鼠骨髓间质干细胞(MSCs)移植治疗脑出血的可行性。**方法:**分离 MSCs 后,连续传代培养、扩增,BrdU 标记的 MSCs 通过颈动脉、侧脑室 2 种途径移植入脑出血大鼠模型体内,采用爬行计分法评估神经功能的恢复程度,并观察脑部 BrdU 阳性细胞的分布。**结果:**通过侧脑室、颈动脉移植后大鼠神经功能改善,明显优于对照组($P<0.05$);经颈动脉注射组较经侧脑室注射组爬杆实验评分低($P<0.05$)。移植的 MSCs 主要迁移到出血灶、大脑皮层、海马区等处。**结论:**MSCs 移植对脑出血具有保护作用,而经颈动脉给药疗效优于经侧脑室给药。

关键词:脑出血;骨髓间充质干细胞;移植;

中图分类号:Q95-3,R743.34 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)21-4030-03

Experimental Study of Bone Marrow Stem Cells Administration in Rats with Intracerebral Hemorrhage

DAI Jie, CHEN Lan, HUANG Zhi-dong, HUANG Huai-Yu

(Department of Neurology, Nantong First People's Hospital, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001)

ABSTRACT Objective: To explore the feasibility of the rat bone marrow stromal cells (MSCs) transplantation to treat intracerebral hemorrhage. **Method:** MSCs were separated from rat bone marrow and cultured with culture medium. The MSCs were purified by culture expanded in vitro and then labeled with BrdU. MSCs were transferred into rat through carotid artery and lateral ventricle. The rat neurologic dysfunction ameliorating was observed by behavior scores, and distribution of BrdU labeled cells in cerebra was studied. **Result:** The test score of carotid artery group was lower than that of lateral ventricle group ($P<0.05$). In the carotid artery group, more BrdU labeled cells survived or migrated. The Transferred MSCs were mainly migrated to area of hippocampus and hemorrhage. They were also differentiated into nerve cells. **Conclusion:** MSCs transferring into rat brain following intracerebral hemorrhage is effective. Intra-arterial administration is more efficient.

Key words: Intracerebral hemorrhage; Mensenchymal stem cells; Transplantation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R743.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)21-4030-03

脑卒中是仅次于心血管疾病、恶性肿瘤的第三位导致人类死亡的疾病,更是导致成人残疾的第一位疾病,发病后 1 个月内病死率 30% -40%,超过 30%的存活者遗留功能缺损^[1,2]。骨髓间质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)可以分化为神经细胞^[3],使其在神经系统疾病得到应用。本实验利用大鼠脑出血模型,观察经不同给药途径,MSCs 的治疗效果以及移植细胞的存活和分布情况。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物:成年雌性 w istar 大鼠,体重 200~250 g,由南通大学实验动物中心提供。主要试剂:a-MEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Trypsin)、二甲基亚砷(DMSO)为 Gibco 公司产品;淋巴细胞分离液(上海恒兴公司);表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)(Sigma 公司);5- 溴 -2 脱氧尿苷(BrdU)及 5- 溴 -2 脱氧尿苷兔单克隆抗体(BrdU Ab)(北京中山生物工程公司)。

1.2 MSCs 的分离、培养和体外标记

MSCs 的分离、培养:参照张化彪等^[4]的文章,10%水合氯醛(5ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠,于无菌条件下取出胫骨和股骨,用密度梯度离心法分离后培养 MSCs。使用流式细胞仪检测 MSCs 表面抗原 CD45、CD11b、CD90,确定纯度。免疫荧光标记:根据使用说明书,在 MSCs 增殖期在培养基中加入 BrdU (浓度 10 μ mol/L)进行标记。

1.3 大鼠纹状体出血模型的制备

10 %水合氯醛(5ml/kg)腹腔注射麻醉 w istar 大鼠(SPF),参照任泽光^[5]的方法,大鼠固定在立体定向仪上,定位于前囟前 0.4mm,中线右侧开 3.0mm、颅骨冠状缝为中心,开深 5.0mm 孔,注射 0.5 μ L VII 型胶原酶(1.0 μ g/ μ L),肝素钠 7U 注入,骨蜡封骨孔后缝合头皮。

1.4 实验动物分组

将 65 只大鼠随机分为 4 组:①不做任何处理的正常组,②仅造模而不行任何处理的对照组,③颈动脉组,造模后经颈动脉移植 MSCs 治疗,④侧脑室组,造模后向侧脑室移植 MSCs 治疗;除外正常组,后两组行移植术后,每组再随机分为术后 1d、3 d、7 d 和 14d 4 个时间点。正常组 5 只大鼠,其余组每个时间点各 5 只大鼠。术后 1d、3 d、7d 和 14d 各组均随机抽取大鼠

作者简介:戴杰(1978-)男,本科,主治医师,研究方向:脑血管疾病方面。电话:13646272258, E-mail: daijie@126.com

(收稿日期:2011-03-27 接受日期:2011-04-23)

进行爬行记分法^[6]评估神经功能缺损。行为学计分后进行脑组织灌注、固定和冰冻切片。

1.5 干细胞移植、分化

培养的 MSCs 制成单细胞悬液,颈动脉组经颈动脉注入细胞浓度为 1×10^4 个/ μL 的 MSCs 悬液 200 μL ;侧脑室组在出血对侧侧脑室处头皮垂直进针,进入约 5mm 后注入 1×10^5 个/ μL 的 MSCs 悬液 20 μL 。细胞数参照 Mahmood 等^[7]实验。免疫组织化学法观察 MSCs 迁移情况,荧光双标法观察 MSCs 在体内是否分化为神经元、星形胶质细胞等神经细胞。

1.6 统计学分析

使用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,大鼠运动功能的评分

采用平均值 $\pm$ 标准差表示, $P < 0.05$ 有显著差异。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

正常组爬行计分为 0,对照组运动功能障碍最明显,颈动脉组和侧脑室组相对较轻。造模各组在术后 3d 爬行记分达最高,7d 开始下降,14d 明显改善;对照组在各个时间点爬行计分均高于颈动脉组和侧脑室组($P < 0.01$);颈动脉组和侧脑室组 14d 时神经功能评分同 1d、3d 和 7d 比较,具有显著性差异($P < 0.01$);14d 时颈动脉组比侧脑室组的神经功能缺损评分低,具有显著性差异($P < 0.05$),具体评分见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点爬行记分比较 ($\bar{x} \pm s$,分)

Table 1 The comparison of crawling scores at different time points among rats in different groups

Group	Number of cases (n)	Crawling score			
		1d	3d	7d	14d
Control group	20	17.34 $\pm$ 2.11	22.22 $\pm$ 3.09	14.78 $\pm$ 2.33	13.44 $\pm$ 2.56
Carotid artery group	20	16.11 $\pm$ 2.43	17.34 $\pm$ 2.56	9.65 $\pm$ 2.41	3.37 $\pm$ 2.66
Lateral group	20	16.45 $\pm$ 2.02	18.54 $\pm$ 3.42	10.18 $\pm$ 1.98	4.87 $\pm$ 2.55

2.2 MSCs 体内迁移及分化

对照组无 Brdu 标记的细胞;经颈动脉和侧脑室移植组 Brdu 阳性细胞主要出现在出血灶周围、大脑皮层、皮层下以及海马,颈动脉组血管内皮细胞处可见少量 Brdu 阳性细胞。通过荧光双标检测发现 Brdu 阳性细胞在体内分化为神经元、星形胶质细胞等神经细胞。

3 讨论

我国脑出血占全部脑卒中 20%~30%,发病率为每年 60~80 人/10 万^[2]。患者的康复依赖于损伤脑组织功能的重建。目前脑出血的治疗上尚缺乏理想的方法。随着干细胞工程的发展,神经干细胞的替代治疗已成为治疗损伤、神经退行性疾病、脑血管疾病的新途径^[8]。骨髓间质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)存在于骨髓间质中,具有多向分化潜能和强大的增殖能力。由于 BMSCs 取材方便、体外扩增能力强、能够避免免疫排斥反应以及可自体移植等诸多优点,广泛应用于治疗出血性脑血管疾病研究^[9,10]。

MSCs 可经多种途径进行移植,目前常见的是经静脉途径移植,这种方法操作简便,但细胞也同时进入了其它脏器,因此到达脑内的细胞数较少,神经功能恢复差^[11]。本试验对比研究脑出血后经颈动脉和侧脑室注射 MSCs 对脑损伤治疗作用的差异,以寻求高效的注射方式。本研究的爬行计分结果可见,颈动脉组和侧脑室组的移植治疗均有明显的疗效,受损的神经功能明显恢复,与对照组相比较,有显著性差异。颈动脉组和侧脑室组均在移植 1d 时就开始发挥疗效,14d 时发挥最大的疗效。免疫组织化学染色发现,Brdu 标记的 MSCs 主要位于出血周边区以及出血侧大脑半球的大脑皮质、海马及血管内皮细胞处,同国内外研究结果相符^[12,13]。Li 等^[14]发现,在成年大鼠卒中后经外周血管移植 MSCs,脑组织可得到修复,神经功能获得

长期恢复。至于 MSCs 如何通过血脑屏障,到达损伤部位,考虑有以下原因:①脑出血损伤后血脑屏障的破坏;②受损伤的脑组织释放 MCP-1, MIP-1 和 IL-8 等趋化因子促使 MSCs 的迁徙^[15];③MSCs 为来源于骨髓的单个核细胞,具有和单核细胞或白细胞相同的移行方式;④脑缺血后局部微血管表达黏附分子,诱导下 MSCs 发生类似于造血干细胞的迁移, MSCs 本身也表达神经细胞黏附分子,促使 MSCs 向病变部位迁移。实验还表明,经颈动脉注射组大鼠较立体定位注射组的爬杆实验评分低,神经系统功能缺损程度轻,移植存活细胞较多,分布范围广,我们认为经侧脑室注射对于急性期的脑出血大鼠造成 2 次打击,经动脉注射的方式则避免了该缺陷。

MSCs 是骨髓中的非造血干细胞,具有多向分化能力,特别是中胚层和神经外胚层来源的组织细胞,研究发现, MSCs 可在一定的条件下分化为神经元样细胞,为神经系统疾病的治疗提供了新的靶向。Kopen 等^[16]在新生小鼠的侧脑室周围注入 MSCs 后,在小鼠的前脑、小脑、纹状体等部位观察到 MSCs 来源的神经元和神经胶质样细胞。Brazelton 等^[17]通过不同的方法观察到在体内条件下,外源的 MSCs 在小鼠脑内可转变为神经元。Zhang 等^[18]研究发现, MSCs 在大鼠脑内可分化成神经元、星形胶质细胞、和少突胶质细胞。上述研究同本研究结果一致,我们通过荧光双标检测发现, MSCs 在体内可分化为神经元和星形胶质细胞,证明 MSCs 具有广泛的分化潜能。除了移植细胞的替代作用,在成年哺乳动物室管膜下区、海马齿状回的颗粒下区,以及脊髓、纹状体、大脑皮质都存在着具有再生能力的内源性神经干细胞。脑卒中时,这些细胞能被激活,并增殖、迁徙以及分化,修复损伤^[19]。Li 等^[20]研究发现, MSCs 能够分泌多种细胞因子,使得宿主脑组织内的神经生长因子、碱性成纤维生长因子以及血管内皮生长因子含量明显增加,促进脑组织中存在神经干细胞增殖、分化,保护神经元。

总之, MSCs 可穿过血脑屏障进入大鼠脑组织中并存活, 向损伤侧的皮层迁移, 能快速恢复大鼠受损的神经功能。MSCs 在体内分化的研究将会对拓展其在神经系统的应用范围, 并提供理论依据, 为临床应用产生深远的意义和影响。

参考文献(References)

- [1] Lu M, Chen JL, Luc DY, et al. Global test statistics for treatment effect of stroke and traumatic brain injury in rats with administration of bone marrow stromal cells [J]. *Neuroscience Methods*, 2003, 128(1): 183-190
- [2] 贾建平. 神经病学[M]. 第六版. 北京: 人民卫生出版社, 2008, 187
Jia JP. *Neurology*[M]. 6th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008, 187
- [3] Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004, 40 (Pt 1): 17-24
- [4] 张化彪, 许予明, 张苏明, 等. 体外诱导大鼠骨髓间质干细胞分化为神经样细胞的实验研究 [J]. *中国神经免疫学与神经疾病杂志*, 2003, 10 :276-279
Zhang HB, Xu YM, Zhang SM, et al. The Experimental Study on Rat Mesenchymal Stem Cells Are Induced to Differentiate into Nerve-like Cells in Vitro[J]. *Chinese journal of neuroimmunology and neurology, Journal*, 2003, 10 : 276-279
- [5] 任泽光, 吴建中. 大鼠脑出血模型[J]. *中华神经外科杂志*, 1993, 9(4): 205- 207
Ren ZG, Wu JZ. Rat model of cerebral hemorrhage [J]. *Chinese Journal of Neurosurgery*, 1993, 9(4): 205- 207
- [6] Brailowsky S, Knight RT, Blook K, et al. Gamma Aminobutyric acid induced potentiation of cortical hemiplegia [J]. *Brain Res* , 1986, 363: 322-330
- [7] Mahmood A, Lu D, Lu M, et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells[J]. *Neurosurgery*, 2003, 53(3): 697- 702
- [8] Lee H J, Kim KS, Kim EJ, et al. Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (5): 1204-1212
- [9] Shen H, Li Y, Chen J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke[J]. *Neuroscience* , 2006 , 137 (2) : 393-399
- [10] Horita Y, Honmou O, Haradak, et al. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84 (7) :1495-1504
- [11] 张化彪, 丁新生, 许予明, 等. 大鼠脑出血模型应用骨髓间质干细胞治疗的实验研究[J]. *中国临床神经科学*, 2004, 12(2): 140-142
Zhang HB, Ding XS, Xu YM, et al. The Experimental Research of Therapeutic Efficacy on Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Transferring into Model of Rat Brain Following Intracerebral Hemorrhage[J]. *Chinese Journal of Clinical Neuroscience*, 2004, 12(2): 140-142
- [12] 都永岗, 张正春, 薛群, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血的实验研究[J]. *中国急诊医学*, 2009, 29(7): 615-618
Du YG, Zhang ZC, Xue Q, et al. Experimental studies of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in intracerebral hemorrhage [J]. *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, 2009, 29 (7): 615-618
- [13] Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat[J]. *J Neurosci Res* 2003; 73(6): 778-786
- [14] Li Y, Chen JL, Zhang CL, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells[J]. *Glia*, 2005, 49 (3): 407-417
- [15] Wang L, Li Y, Chen X, et al. MCP.1, MIP.1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture[J]. *Hematology*, 2002, 7(2): 113-117
- [16] 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(19): 10711-10716
- [17] Brazelton TR, Rossini FM, Keshet GL, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice [J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1775-1779
- [18] Zhang H, Huang Z, Xu Y, et al. Differentiation and neurological benefit of the mesenchymal stem cells transplanted into the rat brain Following Intracerebral hemorrhage [J]. *Neurol Res*, 2006, 28 (1): 104-112
- [19] Zhang R, Zhang Z, Wang L, et al. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(4): 441-448
- [20] Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 1311-1319