

干细胞移植对大脑中动脉闭塞模型 鼠脑组织 miR-34a 及 survivin 表达的影响

周成芳, 黄春兰, 汤永红

南华大学附属第二医院神经内科, 湖南省衡阳市 421001

摘要: **目的** 观察骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 移植对缺血再灌注损伤后大鼠脑组织 miR-34a 和 survivin 表达的影响, 探讨 BMSCs 移植的抗凋亡和神经保护作用机制。 **方法** 将 192 只大鼠随机分为空白组、模型组、PBS 液移植组和干细胞移植组; 采用改良 Longa 线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞再灌注 (MCAO) 模型; 通过尾静脉注射法行干细胞移植; 改良大鼠神经功能缺损评分 (mNSS) 评估神经功能缺损; 免疫组化检测 survivin 的表达; 实时荧光定量 PCR 技术检测 miR-34a 的表达。 **结果** 干细胞移植组的神经功能缺损评分在 12 h、1 d 时与模型组比较无明显差异 ($P > 0.05$); 3 d、7 d 时明显低于模型组 ($P < 0.05$)。干细胞移植组的 survivin 阳性细胞率在各时间点均显著高于模型组 ($P < 0.05$)。干细胞移植组的 miR-34a 表达量在各时间点均显著低于模型组 ($P < 0.01$)。 **结论** 大鼠脑缺血 - 再灌注损伤可致病灶区 miR-34a 的表达上调; 干细胞移植可明显改善脑缺血 - 再灌注大鼠的神经功能; 移植干细胞可能通过下调病灶区 miR-34a 和上调 survivin 的表达发挥抗凋亡及神经保护作用。

关键词: 脑缺血 - 再灌注; 骨髓间充质干细胞; 移植; miR-34a; survivin; 抗凋亡; 大鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.02.002

Stem cell transplantation affects the protein expression of miR-34a and survivin in brain tissue in rats with middle cerebral artery occlusion

ZHOU Cheng-Fang, HUANG Chun-Lan, TANG Yong-Hong. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

Corresponding Author: TANG Yong-Hong, E-mail: tang6246@tom.com

Abstract: Objective To investigate the influence of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSCs) transplantation on the protein expression of miR-34a and survivin in the brain tissue in rats with ischemia-reperfusion injury, as well as the anti-apoptotic and neuroprotective effects of BMSCs transplantation. **Methods** A total of 192 rats were randomly divided into blank group, model group, PBS transplantation group, and stem cell transplantation group. The modified Longa suture method was used to establish the rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO), and tail vein injection was performed for stem cell transplantation. The modified neurological severity score (mNSS) was used to evaluate neurological defects, immunohistochemistry was used to measure the protein expression of survivin, and quantitative real-time PCR was used to measure the protein expression of miR-34a. **Results** The mNSS scores at 12 hours and day 1 showed no significant differences between the stem cell transplantation group and the model group ($P > 0.05$), while compared with the model group, the stem cell transplantation group had significantly lower mNSS scores on days 3 and 7 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the stem cell transplantation group had significantly higher rates of survivin-positive cells at all time points ($P < 0.05$), and significantly lower protein expression of miR-34a at all time points ($P < 0.01$). **Conclusions** The ischemia-reperfusion injury in brain upregulates the protein expression of miR-34a in lesions, and stem cell transplantation can significantly improve the neurological function in rats with ischemia-reperfusion. Stem cell transplantation exerts its anti-apoptotic and neuroprotective effects through downregulating miR-34a and upregulating survivin in lesions.

Key words: cerebral ischemia-reperfusion; bone marrow mesenchymal stem cell; transplantation; miR-34a; survivin; anti-apoptosis; rat

基金项目: 湖南省科技厅计划项目 (2012FJ3104)

收稿日期: 2015-12-17; 修回日期: 2016-04-07

作者简介: 周成芳 (1967-), 男, 副主任医师, 学士学位, 主要从事脑血管疾病的相关研究。E-mail: zhouchengfang88@163.com。

通讯作者: 汤永红 (1962-), 男, 主任医师、教授, 硕士学位, 主要从事癫痫疾病诊治、干细胞移植及脑血管病等相关研究。E-mail: tang6246@tom.com。

survivin 蛋白是细胞凋亡网络激活后产生的关键抗凋亡蛋白,它通过抑制病变组织中 Caspase-3 蛋白水解酶的作用,切断凋亡下游通路,发挥抗凋亡作用。miR-34a 是一种已经被证实的促凋亡微小 RNA^[1],实验证实,癫痫持续状态后大鼠海马神经元中 miR-34a 的表达显著高于正常,造成海马区神经元的大量凋亡^[2]。国内外均有文献^[3]提示 survivin 可能是 miR-34a 的靶基因,miR-34a 通过负性调控 survivin 蛋白的生成,调控细胞凋亡的病理生理过程:Cao 等^[4]研究发现,胃癌细胞系 HGC-27 的 miR-34a 的表达水平明显低于正常细胞,促进了 HGC-27 细胞系的凋亡;进一步研究发现转染了 miR-34a 的 HGC-27 细胞 survivin 基因的表达明显低于未转染细胞,证明 miR-34a 通过靶向调控 survivin 的表达来调控胃癌细胞的凋亡过程。胡猛等^[5]发现向肝癌细胞株 HepG2 转染 miR-34a 后, HepG2 细胞的 survivin 蛋白表达下调,凋亡细胞增加。

脑缺血-再灌注后,缺血半暗带的神经元迟发性死亡(delayed neural death, DND)是导致病情加重、恶化的重要因素,细胞凋亡是 DND 的主要形式。在上述文献证据的支撑下,我们推测:脑缺血再灌注损伤后,缺血敏感区脑组织高表达 miR-34a,导致 survivin 蛋白的产量下降,是造成缺血区脑细胞凋亡的机制之一。来自基础实验及临床研究的大量资料证实干细胞移植对缺血性脑损伤具有保护作用^[6,7],但其发挥神经保护作用的具体机制尚不完全清楚。干细胞移植的神经保护作用机制是否与调节 miR-34a 及 survivin 蛋白的生成有关?本实验通过研究干细胞移植对缺血再灌注损伤大鼠脑组织 miR-34a 及 survivin 表达的影响,探讨干细胞移植的抗凋亡和神经保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂

生长 45~55 d 左右的健康雄性 SD 大鼠 192 只,体重约 250~300 g 左右,由南华大学动物实验部提供。

RNAstore 试剂、TRNzol-A + 总 RNA 提取试剂、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒、miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒均购至天根生化科技有限公司;miR-34a 的引物序列为 F Primer: AGCCGCTG-GCAGTGTCTTA、R Primer: CAGAGCAGGGTCCGAGG-TA,内参 U6 的引物序列为 F Primer: ATTGAACGAT-

ACAGAGAAGATT、R Primer: GGAACGCTTCACGAATTTG,引物、内参 U6、目的茎环引物均由上海吉码制药有限公司设计合成,并且经过验证、商品化、已经通过多个科研机构使用和认可;兔抗鼠 survivin 抗体(一抗)、免疫试剂盒(带 DAB,二抗)由武汉博士德生物工程有限公司生产;骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)由南华大学附属第二医院生物细胞中心惠赠。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备及成功模型的判定 采用文献中描述的改良 Longa 线栓法^[8]创建大鼠大脑中动脉闭塞(middlecerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型。采用 5 分制评分法对造模后的大鼠进行评分:无神经损伤症状(0 分);不能完全伸展对侧前爪(1 分);向对侧转圈(2 分);向对侧倾倒(3 分);不能自发行走,意识丧失(4 分)。评分为 0 分和 4 分的大鼠排除出实验,评分为 1~3 分的大鼠为造模成功模型。

1.2.2 实验分组及处理 随机将大鼠分为 4 组:空白组、模型组、PBS 液移植组和干细胞移植组。空白组:接受造模过程中的皮肤切开,分离暴露颈动脉等手术操作,但不行动脉栓塞;模型组:参照文献复制^[8] MCAO 模型,造模成功后,不做其他处理;PBS 液移植组:MCAO 造模成功后 6 h 经尾静脉注射 PBS 液(1 ml);干细胞移植组:造模成功后 6 h 采用尾静脉注射法移植 BMSCs(1 ml,含 1×10^6 个干细胞)。各组分别于缺血-再灌注后 12 h、1 d、3 d、7 d 进行相应指标的观测。

1.2.3 尾静脉注射方法 PBS 液移植组和干细胞移植组在造模成功后 6 h,将大鼠置于固定器内,露出鼠尾,热水浸泡及酒精涂擦处理后,选择一条扩张最明显的尾静脉作为穿刺静脉。

1.2.4 神经功能缺损评分 参照改良大鼠神经功能缺损评分(Modified Neurological Severity Score, mNSS)细则对实验大鼠的神经功能进行评分,最大分值 18 分。

1.2.5 动物处死及标本的制备 四组大鼠于各观测时间点随机抽取 6 只,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg)行腹腔注射麻醉。用于 PCR 检测的大鼠直接断头取脑,在冰面上分离右侧缺血区脑组织,置于去酶 EP 管中,加入 10 倍体积的 RNAstore,于 4℃ 浸泡过夜后,转入 -20℃ 冰箱中长期保存;用于制备免疫组化切片的大鼠麻醉后,开胸暴露心

脏,右心耳剪口,左心室内穿刺进针,快速灌注生理盐水 200 ml 后,继续灌注 4% 多聚甲醛约 300 ml,大鼠四肢强直后拔出穿刺针,迅速断头,取出完整脑组织浸泡于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,用于制备石蜡切片。

1.2.6 免疫组化检测 survivin 蛋白 脑组织经甲醛固定,常规石蜡包埋,以缺血灶为中心连续冠状切片,脱蜡、水化,微波加热修复后,滴加山羊血清封闭 20 min,继之滴加一抗 4℃ 孵育过夜。滴加 SABC 液 37℃ 孵育 30 min 后,DAB 显色、苏木精复染、梯度脱水、封片、显微镜下观察计数阳性细胞数并拍片。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测 microRNA-34a 脑组织于液氮中研磨成粉状,以每 30 ~ 50 mg 组织加入 1 ml TRNzol-A⁺ 的比例加入 TRNzol-A⁺ 混匀,经异丙醇沉淀后获得总 RNA;根据第一链合成试剂盒的操作步骤逆转录合成 cDNA 第一链;根据荧光定量检测试剂盒的操作说明行荧光定量检测,所使用的引物及内参 U6 由上海吉码制药有限公司设计合成。采集荧光数据后,使用 2^{-ΔΔCT} 法计算 mi-

croRNA-34a 的相对表达量。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 统计软件处理数据。用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示计量资料,正态性及方差齐性检验用 K-S、Levene 检验;均数的比较,多组间用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两组间比较用 LSD-*t* 检验;总体率的比较用 χ^2 检验。设 $\alpha = 0.05$ 为检验标准,当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

模型组、PBS 液移植组和干细胞移植组在各时间点神经功能缺损评分均高于空白组 ($P < 0.01$);模型组与 PBS 液移植组神经功能缺损评分在各时间点差异无统计学意义 ($P > 0.05$);12 h、1 d 时干细胞移植组与模型组、PBS 液移植组神经功能缺损评分比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);3 d、7 d 时干细胞移植组神经功能缺损评分明显低于模型组和 PBS 液移植组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组在各时间点神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	1 d	3 d	7 d
空白组	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
模型组	9.83 ± 2.04 [#]	15.17 ± 1.47 [#]	12.17 ± 2.23 [#]	10.83 ± 1.47 [#]
PBS 液移植组	9.67 ± 1.97 [#]	15.00 ± 1.67 [#]	12.00 ± 2.10 [#]	11.00 ± 2.37 [#]
干细胞移植组	10.00 ± 2.53 [#]	13.33 ± 2.16 [#]	8.33 ± 1.21 ^{#*}	6.83 ± 0.75 ^{#*}

注: #表示与空白组比较, $P < 0.01$; *表示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 免疫组化检测 survivin 的表达

模型组、PBS 液移植组和干细胞移植组在各时间点 survivin 表达均明显高于空白对照组 ($P < 0.01$);模型组在各时间点 survivin 表达与 PBS 液移

植组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);干细胞移植组在各时间点 survivin 表达均显著高于模型组和 PBS 液移植组 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1、图 2。

表 2 各组脑组织 survivin 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$; %)

组别	12 h	1 d	3 d	7 d
空白组	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
模型组	11.00 ± 2.61 [#]	19.17 ± 3.76 [#]	31.00 ± 3.03 [#]	13.00 ± 2.61 [#]
PBS 液移植组	10.67 ± 2.16 [#]	20.00 ± 3.46 [#]	32.33 ± 4.18 [#]	14.33 ± 3.14 [#]
干细胞移植组	16.33 ± 2.16 ^{#*}	29.00 ± 5.48 ^{#*}	44.83 ± 3.76 ^{#*}	25.00 ± 4.60 ^{#*}

注: #表示与空白组比较, $P < 0.01$; *表示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 miR-34a 的表达

模型组、PBS 液移植组和干细胞移植组在各时间点脑组织 miR-34a 相对表达量均明显高于空白对照组 ($P < 0.01$);模型组在各时间点脑组织 miR-34a

相对表达量与 PBS 液移植组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);干细胞移植组在各时间点脑组织 miR-34a 相对表达量均显著低于模型组和 PBS 液移植组 ($P < 0.01$)。见表 3、图 3。

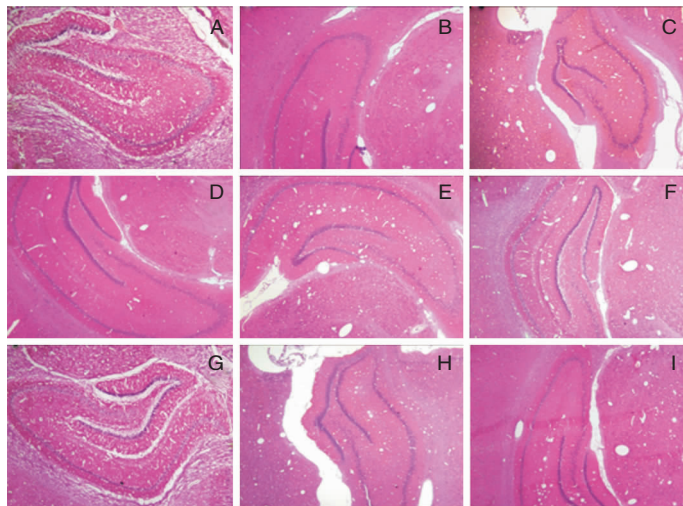


图1 各组大鼠脑组织 HE 染色(×4)。A:空白对照组;B:12 h 模型组;C:12 h 干细胞移植组;D:1 d 模型组;E:1 d 干细胞移植组;F:3 d 模型组;G:3 d 干细胞移植组;H:7 d 模型组;I:7 d 干细胞移植组。

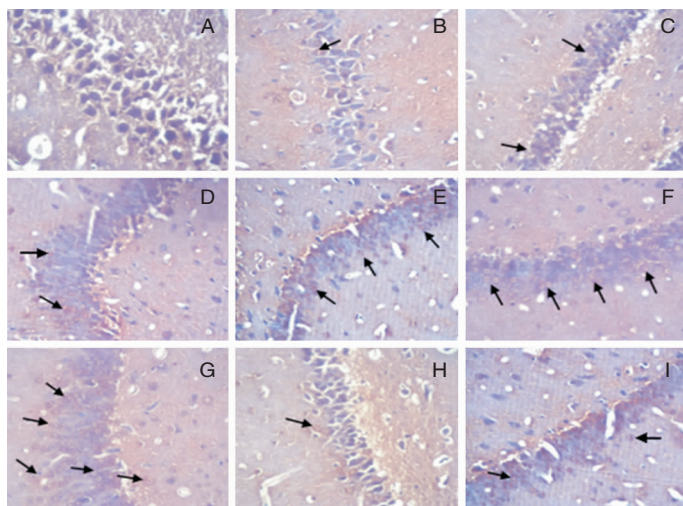


图2 各组大鼠脑组织免疫组化(×40),箭头所示为 survivin 阳性细胞。A:空白对照组;B:12 h 模型组;C:12 h 干细胞移植组;D:1 d 模型组;E:1 d 干细胞移植组;F:3 d 模型组;G:3 d 干细胞移植组;H:7 d 模型组;I:7 d 干细胞移植组。

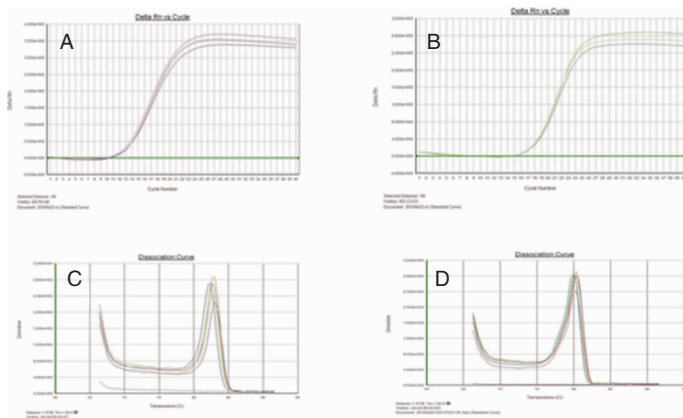


图3 内参 U6、miR-34a 的扩增曲线及溶解曲线。A:内参 U6 扩增曲线;B:miR-34a 扩增曲线;C:内参 U6 溶解曲线;D:miR-34a 溶解曲线。

表 3 各组各时间点脑组织 miR-34a 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	1 d	3 d	7 d
空白组	1.1187 ± 0.1241	1.1187 ± 0.1241	1.1187 ± 0.1241	1.1187 ± 0.1241
模型组	4.7698 ± 0.2569 [#]	3.7305 ± 0.2985 [#]	3.0697 ± 0.2067 [#]	2.6898 ± 0.1998 [#]
PBS 液移植组	4.7388 ± 0.2147 [#]	3.7705 ± 0.2378 [#]	2.9782 ± 0.2153 [#]	2.6682 ± 0.1879 [#]
干细胞移植组	4.0532 ± 0.2082 ^{#*}	2.8338 ± 0.2391 ^{#*}	2.5525 ± 0.1101 ^{#*}	2.0438 ± 0.2608 ^{#*}

注: #表示与空白组比较, $P < 0.01$; *表示与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

大量研究资料证实干细胞移植对脑缺血 - 再灌注损伤具有保护作用,其可以通过修复替代受损神经元、改善病灶局部微环境等^[9-11]众多机制发挥神经保护作用。我们的实验数据显示,干细胞移植组 3 d 后的神经功能缺损评分明显低于模型组,再次证实干细胞移植可改善脑缺血 - 再灌注大鼠的神经功能,对缺血性脑损伤具有一定的保护作用。但是通过横向比较干细胞移植对神经功能缺损评分、survivin 蛋白、miR-34a 表达的影响,我们发现,干细胞移植组与模型组、PBS 液移植组比较,神经功能缺损评分在 12 h、1 d 均无明显差异,直到 3 d 时才出现显著性下降,这与以往研究者得出的结论一致^[12, 13],但是 survivin 蛋白及 miR-34a 的表达从 12 h 开始各实验组就出现了显著性差异。出现神经行为学症状的改变滞后于脑组织内代谢物质变化的原因可能是,疾病症状的恢复涉及体液及病灶微环境的改善、细胞功能的修复、缺失细胞的再生替代等诸多机制,因而滞后于分子生物学水平所检测的单一观测指标的改变。

促凋亡 miR-34a 是否参与脑缺血 - 再灌注损伤这一病理生理过程,目前国内尚未有文献报道。我们的实验结果显示在缺血 - 再灌注损伤后 miR-34a 的表达量明显升高,证实了 miR-34a 参与了脑缺血 - 再灌注这一病理生理过程。分析各实验组的数据结果,模型组 miR-34a 及 survivin 蛋白的表达水平均明显高于空白组,说明缺血 - 再灌注损伤后,脑组织中的促凋亡通路及抗凋亡通路均处于激活状态;干细胞移植干预使 miR-34a 的表达下调后,survivin 蛋白的表达水平升高,表明 survivin 蛋白的表达水平与 miR-34a 的表达水平呈负相关关系。干细胞移植干预后,促凋亡 miR-34a 的表达量下降,抗凋亡 survivin 蛋白的生成量相应增多,最终大鼠的神经功能缺损评分明显下降,提示移植干细胞可能通过下调病灶区 miR-34a、上调 survivin 蛋白的表达发挥抗凋亡作用。

但上述结论仅是我们研究的初步成果,需要进一

步通过荧光素酶和 β -gal 双荧光报告系统检测 miR-34a 对 survivin 是否存在靶向调控作用,从而阐明 miR-34a 能否通过靶向调控 survivin 蛋白的表达实现对缺血 - 再灌注损伤后神经元迟发性死亡进行调控。

参 考 文 献

[1] 黄春兰, 汤永红. MicroRNA-34a 在神经系统疾病中的研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, 41 (3): 293-296.

[2] 解媛媛. miR-34a 对大鼠 SE 后海马神经元凋亡的促进作用. 第五届 CAAE 国际癫痫论坛论文集, 2013.

[3] Yang B, Huang J, Liu H, et al. miR-335 directly, while miR-34a indirectly modulate survivin expression and regulate growth, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells. Tumor Biol, 2015.

[4] Cao W, Fan R, Wang L, et al. Expression and regulatory of miRNA-34a in targeting surviving in gastric cancer cells. Tumor Biol, 2013, 34(2): 963-971.

[5] 胡猛. miR-34a 通过调控 Survivin 表达对肝癌生物学行为的影响. 苏州大学, 2014.

[6] Neirinckx V, Coste C, Rogister B, et al. Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(4): 284-296.

[7] 杨柳. 干细胞移植治疗缺血性脑卒中患者 10 例安全性及短期疗效观察. 辽宁中医药大学, 2013.

[8] Longa E, Weinstein P, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery: occlusion without craniectomy in rats. J Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[9] Yang HQ, Zhang RH, Du L, et al. Clinical study of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation therapy for spinal cord injury. Prog Mod Biomed, 2012, 12(3): 518-521.

[10] Hsu YC, Chen SL, Wang DY, et al. Stem cell-based therapy in neural repair. Biomed J, 2013, 36(3): 98-105.

[11] Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. Neuropathology, 2013, 33(5): 491-504.

[12] 汤永红, 王芳. 骨髓间充质干细胞移植对缺血性脑卒中大鼠 IL-10、TGF- β 1 表达的影响. 中华医学会第十七次全国神经病学学术会议, 2014.

[13] 谢帆. BMSCs 移植对缺血性脑卒中大鼠 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响. 南华大学, 2014.