

骨髓间质干细胞移植减轻犬急性脑梗死模型的缺血性脑损伤研究

冷辉林, 蔡龙

江西省宜春市人民医院神经内科, 江西省宜春市 336000

摘要: **目的** 观察骨髓间质干细胞(BMSCs)对犬急性缺血脑组织的保护作用,并探讨其可能的机制。**方法** 将24只成年杂交犬随机分为治疗组及对照组,DSA引导下自体血栓栓塞大脑中动脉闭塞缺血模型制作,并抽取骨髓提取 BMSCs,传代并给予4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)标记;1周后开颅行多点脑内注射 BMSCs 移植;移植后1周行脑 DWI 序列扫描,计算梗死灶体积;4周后将犬处死,每组随机选择6只动物取脑标本行 TTC 染色测定梗死灶体积;另外6只动物进行 HE 染色、VG 染色、TUNEL 染色评价脑损伤情况;免疫荧光染色了解脑源性神经营养因子(BDNF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达情况。**结果** 治疗组梗死灶内广泛存在 DAPI 阳性细胞。治疗组的梗死灶体积明显小于对照组, $P < 0.01$ 。治疗组梗死灶范围、梗死灶内细胞坏死、胶质增生和胶质瘢痕均较对照组减轻。治疗组凋亡细胞明显少于对照组, $P < 0.05$ 。治疗组细胞因子 BDNF、bFGF、IGF-1 和 VEGF 表达阳性的细胞均显著多于对照组。**结论** 脑梗死后给予 BMSCs 移植, BMSCs 能存活并自行向梗死灶迁移,并发挥脑保护作用,其机制可能和分泌多种神经营养因子有关。

关键词: 骨髓间质干细胞;脑梗死;细胞凋亡;细胞因子

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2017.03.009

Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation reduces ischemic brain injury in a dog model of acute cerebral infarction

LENG Hui-Lin, CAI Long. Department of Neurology, People's Hospital of Yichun City, Yichun, Jiangxi 336000, China

Corresponding author: LENG Hui-Lin, E-mail: renghuilin@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on acute ischemic brain tissue and possible mechanisms. **Methods** A total of 24 hybridized adult dogs were randomized into treatment group and control group. A model of ischemia was established by digital subtraction angiography-guided middle cerebral artery occlusion using autologous blood clots. Bone marrow aspiration was performed to collect BMSCs, and then BMSCs were subcultured and labeled by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Craniotomy was performed at 1 week after modeling and BMSCs were transplanted via intracerebral injection at multiple sites. At 1 week after transplantation, brain diffusion-weighted imaging was performed to calculate infarct volume. The dogs were sacrificed at 4 weeks after transplantation, 6 dogs were randomly selected from each group to collect brain tissue, and TTC staining was performed to measure infarct volume; HE staining, Van Gieson staining, and TUNEL staining were performed for the other 6 dogs in each group to evaluate brain injury. Immunofluorescent staining was performed to measure the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Results** The treatment group had many DAPI-positive cells widely dispersed in infarct. The treatment group had a significantly smaller infarct volume than the control group ($P < 0.01$). Compared with the control group, the treatment group had significant alleviation in infarct extent, cell necrosis in infarct, gliosis, and glial scar. The treatment group had a significantly lower number of apoptotic cells than the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the treatment group had significantly higher numbers of cells with positive expression of BDNF, bFGF, IGF-1, and VEGF. **Conclusions** When transplantation of BMSCs is performed after cerebral infarction, BMSCs can survive, migrate to infarct, and then protect the brain, possibly by secreting various neurotrophic factors.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell; cerebral infarction; cell apoptosis; cytokine

基金项目:江西省科技计划项目(20112BBG70085)

收稿日期:2017-01-10;修回日期:2017-05-27

作者简介:冷辉林。E-mail:renghuilin@163.com。

脑缺血后的损伤机制复杂多样,大量研究表明,干细胞移植对脑缺血损伤可能具有令人鼓舞的治疗作用。骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)除能定向分化成神经组织细胞^[1]外,同时具有分泌脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)、碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种神经营养因子的能力^[2-5]。另外,BMSCs与其他干细胞相比,具有易分离、体外扩增能力强、免疫原性低等优点^[6]。BMSCs移植治疗脑梗死不仅能减轻脑受损组织的变性坏死,而且还能对受损组织进行功能和结构的修复,但其作用机制目前仍不清楚^[7]。本实验将研究局部脑组织注射移植 BMSCs 对犬大脑中动脉闭塞模型缺血脑组织的治疗作用并探讨其可能的作用机制。

1 实验动物

本研究选用实验用成年杂交犬 24 只,随机分为治疗组和对照组;两组动物均行经动脉造影指导下大脑中动脉自体血栓栓塞脑缺血模型制作。

2 方法

2.1 脑缺血动物模型制备及取材

2.1.1 BMSCs 抽取、分离及传代 将实验犬吸入麻醉后,无菌条件下用骨穿针穿刺实验犬的股骨大转子,用含肝素钠 3000 U 的 10 mL 注射器抽取骨髓 2 mL,按 1:1 加入含有 1.077 g/mL 的 Ficoll 淋巴细胞分离液的离心管中进行密度梯度离心(1500 r/min, 30 min),以尖头吸管小心吸取中间云雾状细胞层,加入磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗并离心除去残留 Ficoll 淋巴细胞分离液,即得单个核细胞。将细胞接种于 25 cm² 培养皿,培养基使用 10% 灭活胎牛血清(FBS) + DMEM 液,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,3 d 后换液,以后每 2~3 d 换液。每 2 d 用倒置相差显微镜进行观察、拍照。待培养皿中的原代 BMSCs 生长至 80% 汇合后,用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶溶液消化,加入含 FBS 的培养液终止胰酶作用,以 1:3~1:4 进行传代培养。取第 3 或 4 代细胞用于移植,调整最终浓度为 2 × 10⁶/ml。移植前 6 h 行 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)标记,并反复用 PBS 洗涤,去除游离的 DAPI。

2.1.2 缺血模型制作 实验用犬给予吸入麻醉后,经股动脉成功置入 4F 血管鞘,引入微导丝及 1.8 F 微导管,顺微导丝将微导管超选进入大脑中动脉 M1 段起始部,使用自体血栓进行大脑中动脉栓塞,造影提示大脑中动脉闭塞表示造模成功。

2.1.3 BMSCs 移植 缺血模型成功后 1 周,在无菌条件对实验动物进行 BMSCs 移植手术。吸入麻醉后对实验犬行去骨瓣手术,在病灶侧给予多点皮质下注射移植,每个部位剂量为 50 μl;对照组给予等剂量 DMEM 培养液注射。

2.1.4 脑梗死体积计算 实验动物在 BMSCs 移植后 1 周进行吸入麻醉,后进行头部 MRI DWI 序列扫描并计算梗死灶体积。

2.1.5 动物处死及标本取材 实验动物脑缺血四周后,将两组实验犬分别随机分为两组,一组吸入麻醉,经心脏进行生理盐水、4% 多聚甲醛序贯灌注固定后断头、取脑组织进行连续切片并行石蜡包埋,选择含梗死灶中心部位、侧脑室嘴侧及海马齿状回的脑组织连续 6 μm 冠状切片,切片贴附于预处理的载玻片上,用前脱蜡至水。相邻切片分别行原位细胞凋亡检测及细胞因子脑源性神经营养因子(BDNF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子 1(insulin-Like growth factor 1, IGF-1)、血管内皮生长因子(VEGF)的免疫荧光染色。另一组麻醉给予生理盐水灌注后直接处死取脑,脑组织 -20℃ 快速冷冻后进行冠状位连续切片,并且投入 2% 红四氮唑(TTC)溶液,37℃ 条件下静置半小时,间断翻动使其均匀染色;染色后迅速置入 4% 多聚甲醛中固定、照相,利用 Luxex.F 图像分析仪测定每个脑片的梗死面积,根据公式 $V = t(A_1 + A_2 + \dots + A_n) - (A_1 + A_n)t/2$ 计算梗死体积,其中 t 为切片厚度, A 为梗死面积。

2.2 组织学评估

2.2.1 在荧光显微镜下观察 DAPI 荧光情况 了解荧光的分布即 BMSCs 在病灶内迁移、存活情况,随机选取皮质、皮质下、底节区各 5 个高倍视野(10 × 40),计数并比较各个区域内每个视野的 DAPI 阳性细胞的平均值。

2.2.2 HE 染色、VG 染色 评估梗死灶的病理学变化。

2.2.3 细胞凋亡的检测 每个脑标本选择 3 张脑片进行梗死侧 TUNEL 染色,每张脑片随机选择 5 个梗死灶周边的高倍视野(10 × 40),计算平均每

个视野的阳性细胞数(个/视野)。

2.2.4 细胞因子 BDNF、BFGF、IGF-1 和 VEGF 的表达检测 每个脑标本选择 5 张脑片,分别用免疫荧光染色检测表达细胞因子 BDNF、BFGF、IGF-1 和 VEGF 的细胞,每张切片随机选取 5 个高倍视野(10×40)计数表达上述细胞因子的细胞数(个/视野);同时在荧光显微镜下观察表达上述细胞因子的细胞与 DAPI 染色阳性细胞的关系。

2.3 统计学分析

全部资料采用 SPSS 18.00 软件包分析,各组计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间均数比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DAPI 标记阳性细胞

治疗组,荧光显微镜下可见病侧内大量 DAPI 标记的细胞存在,而对照组无类似细胞出现。治疗组皮质、皮质下和底节区 3 个不同脑区的高倍视野 DAPI 阳性细胞均数分别为 16.3 ± 3.2 、 17.4 ± 2.2 和 15.8 ± 4.6 ,组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2 HE 染色及 VG 染色病理学观察

HE 染色标本显微镜下观察发现,病变侧脑组织萎缩,坏死核心区形成中风囊,其周围脑组织中神经元数量减少。VG 染色发现,对照组可见梗死处脑组织被胶质细胞和胶质纤维充填,形成胶质瘢痕,局部脑萎缩,软化灶形成;BMSCs 组可见在移植部位出现典型的神经细胞样形态学改变,胶质瘢痕和软化灶减小。

3.3 梗死灶体积

根据磁共振 DWI 序列和 TTC 染色进行梗死灶体积计算发现治疗组梗死灶体积均明显小于对照组($P < 0.01$)。见表 1。

3.4 细胞凋亡

每个脑标本选择 3 张脑片进行梗死侧 TUNEL 染色,每张脑片随机选择 5 个梗死灶周边的高倍视野,计算平均每个视野的凋亡细胞数。实验发现治疗组梗死灶周边每个高倍视野凋亡细胞为(8.3 ± 1.2)/HP,显著低于对照组的(25.5 ± 1.9)/HP($P < 0.05$)。见表 1。

3.5 细胞因子检测

通过免疫荧光染色图片与 DAPI 图片进行合并,发现移植的 BMSCs 能产生 BDNF、BFGF、IGF-1 和 VEGF 等多种细胞因子,同时发现对照组中也可

见到少量的表达上述细胞因子的细胞。治疗组各脑区 BDNF、BFGF、IGF-1 和 VEGF 阳性细胞均数较对照组明显增加($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 治疗组及对照组梗死灶体积及细胞凋亡计数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脑梗死体积(ml)		凋亡细胞(个/HP)
	DWI 法	TTC 法	
治疗组	8.04 ± 0.48	9.58 ± 0.36	8.3 ± 1.2
对照组	13.76 ± 0.66	16.16 ± 0.46	25.5 ± 1.9
t	4.5	4.3	5.2
P	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$

表 2 治疗组与对照组表达细胞因子的细胞数 (个/HP; $\bar{x} \pm s$)

组别	BDNF	BFGF	IGF-1	VEGF
治疗组	31.0 ± 6.7	29.3 ± 3.8	33.2 ± 4.4	35.8 ± 5.2
对照组	13.0 ± 4.5	12.3 ± 5.8	15.5 ± 4.9	17.0 ± 7.9
t	2.8	4.3	5.2	7.1
P	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.001$

4 讨论

神经干细胞参与脑损伤修复的基础研究为脑缺血损伤的治疗带来了新的曙光^[8]。BMSCs 是来源于骨髓的非造血干细胞,在适宜的条件下,可以跨胚层分化成神经细胞。随着 BMSCs 的体外培养成功、分离纯化、建立细胞系及定向诱导分化等技术的成熟,BMSCs 移植治疗脑梗死可能性逐步向前推进^[8-11]。与神经干细胞和胚胎干细胞相比,BMSCs 有以下优点:易获得性、体外培养能快速扩增、可自体移植、免疫耐受性好、能与宿主大脑整合并长期存活、骨髓细胞可以分泌大量的生长因子和促血管生长因子。

有研究表明,干细胞移植越早进行效果越好^[8-11];但也有研究显示,脑梗死早期可能由于局部水肿、各种兴奋性氨基酸毒性等因素,细胞成活率较低,1 周左右更为合适^[12]。本研究表明,缺血后 1 周进行干细胞移植,一方面移植细胞能够存活、迁移,同时也能发挥脑保护作用,移植治疗组脑梗死体积较对照组减少,上述结果对于未来临床应用具有一定的启示意义。

BMSCs 移植发挥脑缺血损伤的治疗作用,存在以下几种机制:①干细胞优先归巢到受损组织,从而促进受损组织修复。②干细胞直接分化为受损神经组织,整合进入宿主神经环路。③通过分泌多种细胞因子,通过抑制凋亡、增强神经萌芽、突触发生、神经传递,促进神经递质的释放。④诱导血

管发生,促进血管生成。⑤增强脑内新的突触和神经联系的形成,诱导宿主脑的自塑性。⑥动员内源性祖细胞归至缺血脑区^[13]。

本研究中,在梗死侧脑组织的皮质、皮质下及基底节区均能看见 DAPI 阳性的 BMSCs,表明 BMSCs 的确存在向病灶区域归巢的倾向,其机制可能是因为:一方面,新生的侧枝循环血管内皮功能及血脑屏障不完整,干细胞更容易向血管外迁移;另一方面,可能是梗死区域内存在大量的炎症因子及细胞趋化因子,导致干细胞向梗死灶内迁移。

研究表明,胶质细胞活化会抑制神经轴索和树突的生长,抑制神经突触的形成,进而阻碍神经修复^[14],而这一修复过程可能是神经再支配和神经功能重塑的重要组织学基础;具体机制可能包括胶质瘢痕的物理屏障作用及活化的胶质细胞产生的某些炎症细胞因子及其他分子。Shen 等^[15]的研究表明,细胞因子 neurocan 可能同时参与促进胶质细胞活化和抑制神经轴索生长两个方面,干细胞移植能够抑制体内外胶质细胞表达该因子。本研究中,干细胞移植组 VG 染色胶质瘢痕显著小于对照组,表明 BMSCs 能够减少胶质细胞的活化、增殖,但是具体机制需要进一步研究。

本研究通过免疫荧光染色表明,干细胞能产生多种神经营养细胞因子,如 BDNF、BFGF、IGF-1 和 VEGF 等,另外在对照组也可见到这些因子的表达,说明缺血性损伤可能会导致内源性神经干细胞的活化。既往文献报道细胞因子可能在细胞增殖、分化、神经突触再生及神经元再网络化等方面发挥重要作用^[16],但具体机制如何,尚需进一步研究。

既往脑缺血再灌注模型均采用大鼠及小鼠为实验对象,得出的结果并不一定适用于人类。本研究适用成熟的杂交实验犬作为研究对象,比较了影像学评价梗死灶体积和组织学测量梗死灶体积,发现二者具有较好的一致性,而影像学检查为无创检查,能帮助我们减少实验动物的样本量;另外大型的动物模型得出的结论可能更接近临床实践。

参 考 文 献

- [1] Wislet-Gendebien S, Leprince P, Moonen G, et al. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116 (Pt 16): 3295-3302.
- [2] Rempe DA, Kent TA. Using bone marrow stromal cells for treatment of stroke [J]. *Neurology*, 2002, 59 (4): 486-

487.

- [3] Wang J, Ding F, Gu Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo [J]. *Brain Res*, 2009, 1262: 7-15.
- [4] Li Y, Chen J, 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.
- [5] Toyama K, Honmou O, Harada K, et al. Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2009, 216 (1): 47-55.
- [6] Camp DM, Loeffler DA, Farrah DM, et al. Cellular immune response to intrastrially implanted allogeneic bone marrow stromal cells in a rat model of Parkinson's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2009, 6: 17.
- [7] Sinden JD, Vishnubhatla I, Muir KW. Prospects for stem cell-derived therapy in stroke [J]. *Prog Brain Res*, 2012, 201: 119-167.
- [8] Komatsu K, Honmou O, Suzuki J, et al. Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2010, 1334: 84-92.
- [9] Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, et al. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats [J]. *Brain Res*, 2004, 1007 (1-2): 1-9.
- [10] 李轶,张重功,马杰.骨髓间充质干细胞移植对大鼠脑梗死的治疗作用 [J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2007, 27 (3): 243-245.
- [11] Tae-Hoon L, Yoon-Seok L. Transplantation of mouse embryonic stem cell after middle cerebral artery occlusion [J]. *Acta Cir Bras*, 2012, 27 (4): 333-339.
- [12] Shen LH, Ye M, Ding XS, et al. Protective effects of MCI-186 on transplantation of bone marrow stromal cells in rat ischemic stroke model [J]. *Neuroscience*, 2012, 223: 315-324.
- [13] Mora-Lee S, Sirerol-Piquer MS, Gutierrez-Perez M, et al. Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): e43683.
- [14] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5 (2): 146-156.
- [15] Shen LH, Li Y, Gao Q, et al. Down-regulation of neurocan expression in reactive astrocytes promotes axonal regeneration and facilitates the neurorestorative effects of bone marrow stromal cells in the ischemic rat brain [J]. *Glia*, 2008, 56 (16): 1747-1754.
- [16] Lanfrancini S, Locatelli F, Corti S, et al. Growth factors in ischemic stroke [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15 (8): 1645-1687.