

骨髓间充质干细胞移植对 VII 型胶原酶诱导的脑出血大鼠模型神经功能的保护作用

阎晓玲 张学斌 唐帆 孔繁明 杜从斌 苏心 王新平

【摘要】 目的 探讨骨髓间充质干细胞(BMMSC)移植对脑出血大鼠模型神经功能的保护作用。**方法** 采用 VII 型胶原酶制备 Sprague-Dawley 大鼠右侧纹状体出血模型,改良神经功能缺损评分(mNSS)、免疫组织化学染色和 TUNEL 法观察 BMMSC 细胞移植治疗后 1、3、7、14 和 28 d 大鼠神经功能改善程度、脑源性神经营养因子(BDNF)表达变化和细胞凋亡情况。**结果** 不同处理组大鼠各观察时间点 mNSS 评分(均 $P=0.000$)、凋亡细胞数目(均 $P=0.000$)差异均有统计学意义。与对照组和模型组相比,移植组大鼠治疗后 28 d mNSS 评分降低($P<0.05$),且呈时间性递减,治疗后 7、14 和 28 d mNSS 评分均低于治疗后 1 和 3 d($P<0.05$);治疗后 1、3、7、14 和 28 d,模型组和移植组大鼠凋亡细胞数目增加($P<0.05$)且于治疗后 7 d 达峰值(均 $P<0.05$),治疗后 14 和 28 d 凋亡细胞数目虽有所减少但仍高于治疗后 1 和 3 d(均 $P<0.05$)。移植组大鼠移植区及周围 BDNF 表达升高,偶见绿色荧光蛋白和胶质纤维酸性蛋白、绿色荧光蛋白和神经元核抗原双表达细胞,表明移植的 BMMSC 细胞已在宿主脑组织中存活并向神经元样细胞和神经胶质样细胞分化。**结论** 由胶原酶诱导的脑出血大鼠模型稳定,可用于脑出血研究。移植的 BMMSC 细胞通过上调 BDNF 表达、减少细胞凋亡而发挥神经保护作用。

【关键词】 脑出血; 骨髓细胞; 干细胞移植; 脑源性神经营养因子; 细胞凋亡; 细胞,培养的; 疾病模型,动物

Neuroprotective effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on collagenase type VII induced cerebral hemorrhage rat model

YAN Xiao-ling¹, ZHANG Xue-bin¹, TANG Fan¹, KONG Fan-ming¹, DU Cong-bin², SU Xin³, WANG Xin-ping²

¹Department of Pathology, ²Department of Neurology, Tianjin Huanhu Hospital; ³Tianjin Neurosurgery Institute, Tianjin 300350, China

Corresponding author: YAN Xiao-ling (Email: ll934065@126.com)

【Abstract】 Objective To investigate the neuroprotective effect of bone marrow mesenchymal stem cell (BMMSC) transplantation on collagenase-induced intracerebral hemorrhage (ICH) adult sprague-Dawley (SD) rat model. **Methods** The collagenase-induced ICH models were constructed by injection of collagenase type VII into the striatum on the right side stereotaxically. Forty-five healthy male SD rats were selected and then randomly divided into 3 groups of fifteen each, control group, ICH rat model group (model group), BMMSC transplanted ICH group (transplantation group). In transplantation group, BMMSC were transplanted into the perilesional sites 2 h after ICH injury. Modified Neurological Severity Score (mNSS), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) immunohistochemical expression, and TUNEL test (cell apoptosis) were assessed at the 1, 3, 7, 14 and 28 d after model-made/transplanted treatment of BMMSC. **Results** The mNSS score ($P=0.000$) and apoptotic cell number ($P=0.000$) of rats in different treatment groups at each observation time point showed statistically significant differences. Compared with the control group and the model group, the mNSS score of the transplantation group was lower 28 d after treatment ($P<0.05$), showing a decreasing timeliness. The mNSS scores 7, 14 and 28 d after treatment was lower than that 1

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.09.007

基金项目:天津市卫生局科技基金资助项目(项目编号:2011KR09)

作者单位:300350 天津市环湖医院病理科(阎晓玲、张学斌、唐帆、孔繁明),神经内科(杜从斌、王新平);300350 天津市神经外科研究所(苏心)

通讯作者:阎晓玲,Email:ll934065@126.com

and 3 d after treatment ($P < 0.05$). On 1, 3, 7, 14 and 28 d after transplantation, the number of apoptotic cells in the model group and the transplantation group increased ($P < 0.05$) and reached the peak on 7 d after treatment (all $P < 0.05$). The number of apoptotic cells on 14 and 28 d was reduced but still higher than that on 1 and 3 d (all $P < 0.05$). In the transplantation group the expression of BDNF protein was significantly increased, and very few GFP + GFAP and GFP + NeuN positive cells were found in the brain tissue. These results indicated that the transplanted BMMSC had survived in the host brain tissue and with neuronal and glial differentiation. **Conclusions** Rat ICH model induced by collagenase type VII is stable for experimental study. The transplanted BMMSC can significantly provide better neuroprotection by increasing BDNF expression and reduce apoptosis.

【Key words】 Cerebral hemorrhage; Bone marrow cells; Stem cell transplantation; Brain-derived neurotrophic factor; Apoptosis; Cells, cultured; Disease models, animal

This study was supported by Science and Technology Foundation of Tianjin Health Bureau (No. 2011KR09).

Conflicts of interest: none declared

脑出血是病残率和病死率较高的脑血管病,严重影响患者生活质量并威胁人类预期寿命,该病以药物治疗为主^[1-4],但尚无特效治疗方法。近年来,随着干细胞技术的兴起,干细胞移植修复神经损伤的应用颇受关注,并已取得一定治疗效果,其中尤以间充质干细胞(MSCs)来源广泛、取材方便、易于体外扩增、免疫排斥反应弱^[5]而成为目前干细胞移植研究的热点。骨髓间充质干细胞(BMMSC)是用于治疗中枢神经系统疾病的理想干细胞^[6-10],相关实验多集中于缺血性卒中和痴呆,鲜有治疗脑出血的文献报道。脑源性神经营养因子(BDNF)可以促进神经元修复和再生、减少神经元凋亡、改善学习记忆能力,并已经多种疾病模型证实^[3,5-8,10]。本研究以Ⅶ型胶原酶诱导的脑出血大鼠为实验模型,观察BMMSC细胞移植治疗后脑组织BDNF表达变化、细胞凋亡和分化,并探讨干细胞移植治疗脑出血的作用机制,以为脑出血的治疗和BMMSC细胞的临床应用提供新的研究方向。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验动物与分组 清洁级健康雄性绿色荧光蛋白(GFP)转基因Sprague-Dawley(SD)大鼠8只,体重为120~150 g,以及清洁级健康雄性成年SD大鼠45只,体重为250~300 g,均购自军事医学科学院实验动物中心[许可证号:GFP转基因大鼠SCXK(京)2005-0004,成年SD大鼠SCXK(京)2005-0001]。饲养环境为室温(25±2)℃、相对湿度40%~60%、12 h昼-12 h夜循环照明环境,自由摄食、饮水,每笼5只,实验对动物的处置符合《关于善待实验动物的

指导性意见》[编号:国科发财字(2006)398号]。共45只成年SD大鼠采用随机数字表法随机分为对照组、脑出血模型组(模型组)和BMMSC细胞移植治疗组(移植组),每组15只。

2. 药品与仪器 (1)药品与试剂:免疫试剂中I抗工作液(1:30)为小鼠抗鼠CD90-异硫氰酸荧光素(FITC)、小鼠抗鼠CD34-藻红蛋白(PE)和小鼠抗鼠CD29-FITC,分别购自英国AbD Serotec公司、美国Santa Cruz公司及BD公司;Cy3标记的羊抗兔IgG II抗为武汉博士德生物工程有限公司产品,通用型PV6001检测试剂盒[包含辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG II抗]和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。Ⅶ型胶原酶、BDNF(1:200)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP,1:100)和神经元核抗原(NeuN,1:100)分别购自美国Sigma-Aldrich公司、北京中杉金桥生物技术有限公司及武汉博士德生物工程有限公司;TUNEL检测试剂盒由瑞士Roche公司提供。(2)仪器与设备: TG150型二氧化碳培养箱和SG60电热恒温干燥箱为法国Jouan公司和美国Fisher公司产品,TE2000-U型倒置荧光显微镜、BX40型生物显微镜和BX63型荧光生物显微镜分别购自日本Nikon公司和Olympus公司, XL100型流式细胞仪为美国Beckman Coulter公司产品, Magnetom Trio A Tim 3.0T MRI扫描仪由德国Siemens公司提供,大鼠脑立体定位仪购自西安西北光电仪器厂, Motic Medical 6.0病理图像采集软件由北京航空航天大学提供。

二、实验方法

1. 骨髓间充质干细胞培养 切取GFP转基因

大鼠股骨和胫骨采集 BMMSC 细胞,常规分离培养、纯化,传至第 3 代时于荧光显微镜下观察细胞形态,加入生理盐水制备细胞悬液,4℃保存备用。选择第 3 代生长良好细胞,于 4℃、离心半径 15 cm、转速 1000 r/min 离心 10 min,弃上清液,滴加磷酸盐缓冲液 400 μ l 配置悬浮细胞(细胞密度为 1×10^3 个/ μ l),4 支流式细胞管收集细胞,每支 100 μ l,其中 3 支分别滴加 CD90、CD34 和 CD29(稀释倍数为 1:30)各 20 μ l(细胞密度 1×10^3 个/ μ l),另 1 支作为空白对照,4℃避光孵育 1 h,磷酸盐缓冲液洗涤($\times 2$ 次),再次以离心半径 15 cm、转速 1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,置 37℃温育 30 min,磷酸盐缓冲液洗涤、滴加磷酸盐缓冲液 500 μ l 重悬细胞,流式细胞术检测 CD90、CD34 和 CD29 阳性率。

2. 脑出血模型制备 以成年 SD 大鼠前囟为原点,分别向后 1.40 mm、矢状缝右侧旁开 3.20 mm 作 2 mm \times 2 mm 正方形骨窗,向下进针 5.60 mm,模型组和移植组大鼠(各 15 只)以微量注射器向其右侧纹状体缓慢注射经无菌生理盐水稀释的 VII 型胶原酶 2 μ l、对照组注射相同体积生理盐水,留针 5 min 使溶液充分扩散后拔针,缝合手术伤口。模型制备后 2 h 行头部 MRI 观察脑出血情况,根据改良神经功能缺损评分(mNSS)评价神经功能,分别以 MRI 显示脑出血、mNSS 评分 7~12 分者为模型制备成功。

3. 骨髓间充质干细胞移植 于模型制备成功后 2 h,经立体定位仪将 10 μ l 的 BMMSC 细胞悬液(密度 1×10^6 个/ μ l)缓慢(< 10 min)注入移植组大鼠右侧纹状体,留针 5 min 使溶液充分扩散;对照组和模型组大鼠注射相同体积生理盐水,方法同移植组。

4. 神经功能评价 BMMSC 细胞移植治疗后 1、3、7、14 和 28 d 时以 mNSS 评分评价大鼠神经功能缺损程度,包括运动测试(提尾实验 2 分、行走 10 分)、感觉测试(3 分)、平衡测试(21 分)、反射消失和异常运动(4 分),总评分共 18 分,评分 1~6 分,轻度损害;7~12 分,中度损害;13~18 分,重度损害。

5. 免疫组织化学染色 神经功能评价后即刻,每组选择 3 只大鼠以质量分数为 10%水合氯醛溶液(200 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,经升主动脉灌注质量分数为 4%多聚甲醛溶液固定,断头取脑,石蜡包埋,制备层厚为 4 μ m 脑组织切片,分别行 BDNF、GFAP 和 NeuN 免疫组织化学染色。采用 Motic Medical 6.0 软件采集病理图像并分析,每一标本随机选取 3 张切片,每张切片观察 5 个互不重叠视野,

计数 BDNF、GFAP 和 NeuN 阳性细胞数,取平均值。以光学显微镜下胞质呈棕黄色为 BDNF 阳性细胞,荧光显微镜下胞质呈红色为 GFAP 阳性细胞、胞核呈红色为 NeuN 阳性细胞。

6. TUNEL 法检测细胞凋亡 每组选择 3 只大鼠,处死和脑组织切片制备方法同前。脑组织切片常规脱蜡、脱水后,滴加蛋白酶 K 工作液(蛋白酶 K 20 μ g/ml 溶于 Tris/HCl 溶液, pH 值 7.4~8.0),37℃温箱孵育 15 min,置于 200 ml 0.10 mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH 值 6.0)、350 W 微波辐射 5 min,磷酸盐缓冲液冲洗($\times 2$ 次);滴加 50 μ l TUNEL 溶液,37℃湿盒孵育 60 min,磷酸盐缓冲液冲洗($\times 3$ 次);滴加 50 μ l 转化剂 POD,37℃湿盒孵育 30 min,磷酸盐缓冲液冲洗($\times 3$ 次);滴加 50~100 μ l DAB 底物溶液,室温孵育 10 min,磷酸盐缓冲液冲洗($\times 3$ 次)。采用 Motic Medical 6.0 软件采集病理图像并分析,每一标本随机选取 3 张切片,每张切片观察 5 个互不重叠视野,计数 200 个细胞中凋亡细胞所占比例,取平均值;光学显微镜下胞核呈深棕色为凋亡细胞。

三、统计分析方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同处理组大鼠各观察时间点 mNSS 评分的比较采用重复测量设计的方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验;不同处理组大鼠各观察时间点凋亡细胞数目的比较采用单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

培养后的 BMMSC 细胞呈长梭形或扁平形伴突起,似纤维样细胞,细胞散在生长,部分细胞集落呈克隆样生长。流式细胞术检测显示,BMMSC 细胞 CD90 阳性率为 99%,CD34 为 0.28%,CD29 为 24.30%;荧光显微镜观察 BMMSC 细胞持续表达绿色荧光蛋白(图 1)。

不同处理组大鼠各观察时间点 mNSS 评分差异有统计学意义(均 $P = 0.000$;表 1,2)。BMMSC 细胞移植治疗后 28 d,仅移植组 mNSS 评分低于模型组($P < 0.05$),余各观察时间点组间差异均无统计学意义($P > 0.05$,表 3)。不同处理组大鼠 mNSS 评分呈时间性递减,对照组和模型组治疗后 7、14 和 28 d 的 mNSS 评分低于治疗后 1 和 3 d(均 $P < 0.05$)、治疗后 28 d 低于治疗后 7 d(均 $P < 0.05$),移植组 BMMSC 细

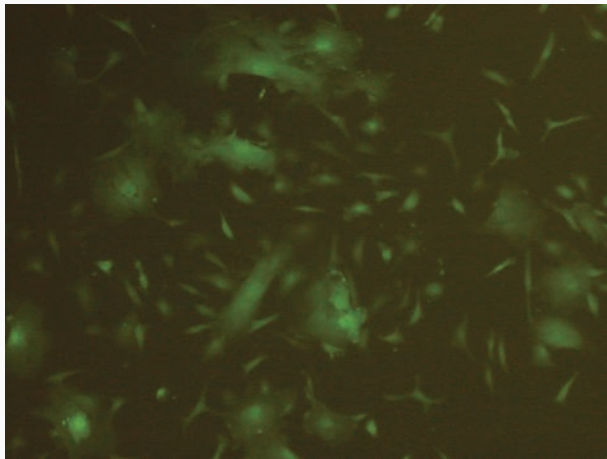


图 1 荧光显微镜观察,经体外培养的大鼠 BMMSC 细胞呈绿色荧光 ×40

Figure 1 Fluorescence microscope showed green fluorescence in vitro cultured rat BMMSC. ×40

表 1 不同处理组大鼠各观察时间点 mNSS 评分的比较($\bar{x} \pm s$, 评分)

Table 1. Comparison of mNSS scores at observation time points of rats in different treatment groups ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	例数	治疗后 1 d(a)	治疗后 3 d(b)	治疗后 7 d(c)	治疗后 14 d(d)	治疗后 28 d(e)
对照组(1)	15	15.33 ± 1.03	14.93 ± 1.63	11.00 ± 1.79	9.83 ± 1.47	7.83 ± 1.47
模型组(2)	15	15.17 ± 1.47	14.97 ± 1.47	11.17 ± 2.14	9.67 ± 1.63	8.00 ± 1.41
移植组(3)	15	15.50 ± 1.51	14.03 ± 1.63	10.00 ± 1.41	7.50 ± 1.09	5.50 ± 0.55

表 2 不同处理组大鼠各观察时间点 mNSS 评分的重复测量设计的方差分析表

Table 2. Anova table of repeated measurement design of mNSS scores at different observation time points of rats in different treatment groups

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
处理因素	16.488	2	8.244	74.318	0.000
测量时间	455.446	4	113.860	17.737	0.000
处理因素 × 测量时间	9.640	8	1.205	10.863	0.000
组间误差	64.193	10	6.419		
组内误差	2.219	20	0.111		

胞治疗后 14 d 亦低于 7 d(均 $P < 0.05$, 表 4)。

光学显微镜观察显示,对照组大鼠 BDNF 呈弱阳性,各观察时间点均无明显变化。治疗后 1 d 时,模型组大鼠血肿周围即可见 BDNF 阳性神经细胞,尤以邻近海马和皮质侧 BDNF 阳性细胞数目明显增多,高于其他区域且呈强阳性表达,从细胞形态看大部分为小胶质细胞,形态不规则,呈圆形或椭圆形,未见明显突起或短粗状突起,呈三角形,胞质呈浅棕色,部分细胞胞质紧邻核膜处可见呈点状排列的 BDNF 强阳性免疫反应颗粒;治疗后 3 d 时 BDNF 阳性细胞数目减少;治疗后 7 d 时仍可见 BDNF 呈弱阳性的细胞,主要为神经元;至治疗后 14 和 28 d 时,

仍有少量 BDNF 呈极弱阳性的神经细胞。移植治疗后 1 d 时,移植区周围即可见 BDNF 表达阳性的神经细胞(图 2a),邻近海马、室管膜下和皮质侧阳性细胞密度和染色深度均高于其他区域(图 2b),从细胞形态看大多为神经元和小胶质细胞,胞质呈浅棕色;治疗后 3 d 时 BDNF 阳性细胞减少,但室管膜下和皮质侧阳性细胞减少不明显;治疗后 7 d 时仍可见 BDNF 呈弱阳性的细胞,主要为神经元和小胶质细胞;至治疗后 14 和 28 d 时仍有少量 BDNF 呈弱阳性的神经细胞。共聚焦显微镜观察,移植组大鼠脑组织中可见在 GFAP 和 NeuN 红色荧光背景下的散在绿色荧光,红色荧光与绿色荧光仅少量重叠,表明移植细胞仅少量转化为神经元和神经胶质细胞。

不同处理组大鼠各观察时间点凋亡细胞数目差异有统计学意义(均 $P = 0.000$, 表 5)。移植治疗后 1、3、7、14 和 28 d 时,模型组和移植组大鼠凋亡细胞数目均多于对照组($P < 0.05$),而治疗后 3 和 7 d 时移植组大鼠凋亡细胞数目少于模型组($P < 0.05$, 表 6);随着移植治疗时间的推移,模型组和移植组凋亡细胞数目均于治疗后 7 d 时达峰值,高于治疗后 1 和 3 d(均 $P < 0.05$),治疗后 14 和 28 d 两组凋亡细胞数目有所降低但仍高于治疗后 1 和 3 d(均 $P < 0.05$, 表 7)。

表 3 不同处理组大鼠同一观察时间点 mNSS 评分的两两比较

Table 3. Pairwise comparison of mNSS scores of rats in different treatment groups at the same observation time

组间 两两比	治疗后 1 d		治疗后 3 d		治疗后 7 d		治疗后 14 d		治疗后 28 d	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) 与 (2)	0.145	0.890	-0.031	0.976	-0.115	0.912	0.139	0.894	-0.171	0.870
(1) 与 (3)	-0.154	0.883	0.698	0.511	0.678	0.523	2.017	0.090	2.343	0.058
(2) 与 (3)	-0.298	0.775	0.729	0.493	0.794	0.457	1.878	0.109	2.514	0.046

表 4 同一处理组大鼠不同观察时间点 mNSS 评分的两两比较

Table 4. Pairwise comparison of mNSS scores of rats in the same treatment group at different observation time points

组内两两比	对照组		模型组		移植组	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
(a) 与 (b)	0.327	0.751	0.149	0.885	1.388	0.195
(a) 与 (c)	3.536	0.005	2.976	0.014	5.192	0.000
(a) 与 (d)	4.490	0.001	4.092	0.002	7.552	0.000
(a) 与 (e)	6.125	0.000	5.335	0.000	9.440	0.000
(b) 与 (c)	3.210	0.009	2.828	0.018	3.804	0.003
(b) 与 (d)	4.165	0.002	3.944	0.003	6.165	0.000
(b) 与 (e)	5.799	0.000	5.186	0.000	8.053	0.000
(c) 与 (d)	0.956	0.362	1.116	0.290	2.360	0.040
(c) 与 (e)	2.589	0.027	2.359	0.040	4.248	0.020
(d) 与 (e)	1.634	0.133	1.243	0.242	1.888	0.088

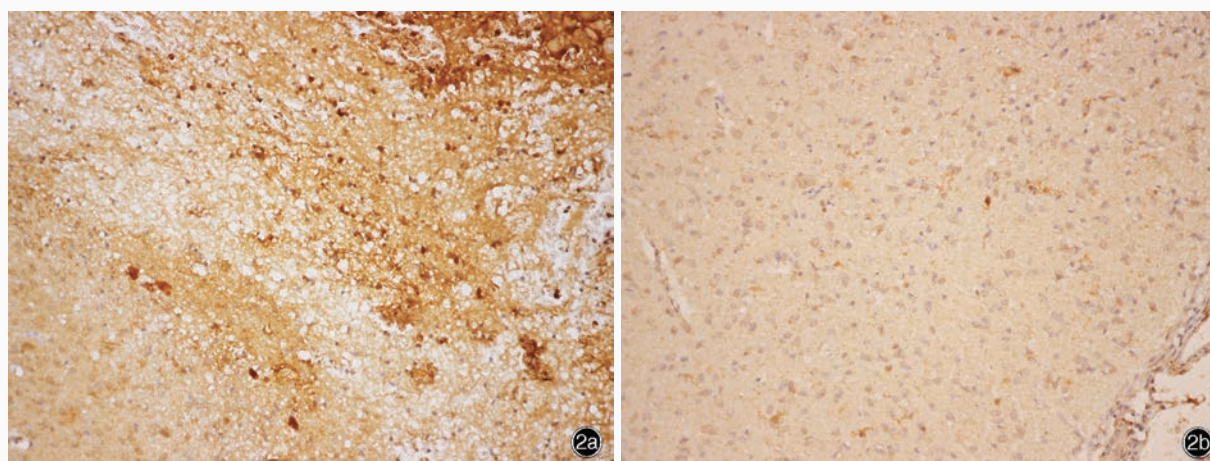


图 2 移植组大鼠光学显微镜观察 免疫组织化学染色(EnVision 二步法) 2a 移植区周围神经元和小胶质细胞 BDNF 呈阳性 ×200 2b 散在于皮质侧的神经元 BDNF 呈阳性 ×100

Figure 2 Optical microscopy findings in rats of transplantation group Immunohistochemical staining (EnVision) Transplanted rats microglial cells and neurons around the graft site were positive for BDNF (Panel 2a). ×200 Scattered cortical neuron cells were positive for BDNF (Panel 2b). ×100

讨 论

出血性卒中占全部脑卒中的 15%~20%，由于病理过程复杂，迄今仍无特效治疗方法^[7]。胶原酶是一种可以分解细胞外基质和血管基底膜上胶原蛋白的金属蛋白酶，主要表达于颅内血管周围的巨噬细胞和单核细胞中，在细胞内失去活性，病理状

态下可自细胞中释放出来并被激活，使血管壁受损渗血，随着血液聚集形成与脑组织混合的小片状出血。基于胶原酶具有分解细胞外基质和血管基底膜胶原蛋白机制，1990 年，Rosenberg 等^[11]建立了由胶原酶诱导的脑出血大鼠模型，目前业已成为脑出血病理生理学机制研究的经典实验，本研究参照其实验原理及相关研究^[12]，采用 VII 型胶原酶制备大鼠

表 5 不同处理组大鼠各观察时间点凋亡细胞数目的比较($\bar{x} \pm s$, 个)

Table 5. Comparison of apoptotic cells in different treatment groups at different observation time points ($\bar{x} \pm s$, number)

组别	例数	治疗后 1 d(a)	治疗后 3 d(b)	治疗后 7 d(c)	治疗后 14 d(d)	治疗后 28 d(e)	F 值	P 值
对照组(1)	3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—	—
模型组(2)	3	4.08 ± 0.78	8.68 ± 1.26	15.36 ± 1.56	15.28 ± 4.03	14.44 ± 1.92	15.395	0.000
移植组(3)	3	3.72 ± 0.86	5.81 ± 1.15	12.82 ± 1.36	11.60 ± 2.90	11.02 ± 2.27	13.579	0.000
F 值		34.066	60.480	142.440	23.164	57.977		
P 值		0.001	0.000	0.000	0.002	0.000		

表 6 不同处理组大鼠同一观察时间点凋亡细胞数目的两两比较

Table 6. Pairwise comparison of the number of apoptotic cells in different treatment groups at the same observation time

组间 两两比	治疗后 1 d		治疗后 3 d		治疗后 7 d		治疗后 14 d		治疗后 28 d	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) 与 (2)	-7.455	0.000	-10.794	0.000	-15.744	0.000	-6.521	0.001	-10.303	0.000
(1) 与 (3)	-6.797	0.001	-7.225	0.000	-13.145	0.000	-4.950	0.003	-7.863	0.000
(2) 与 (3)	0.658	0.535	3.569	0.012	2.604	0.040	1.570	0.167	2.440	0.051

表 7 同一处理组大鼠不同观察时间点凋亡细胞数目的两两比较

Table 7. Pairwise comparison of apoptotic cell number at different observation time points of the same treatment group

组内 两两比	模型组		移植组		组内 两两比	模型组		移植组	
	t 值	P 值	t 值	P 值		t 值	P 值	t 值	P 值
(a) 与 (b)	-2.542	0.029	-1.367	0.202	(b) 与 (d)	-3.647	0.005	-3.787	0.004
(a) 与 (c)	-6.234	0.000	-5.952	0.000	(b) 与 (e)	-3.183	0.010	-3.408	0.007
(a) 与 (d)	-6.190	0.000	-5.154	0.000	(c) 与 (d)	0.044	0.966	0.798	0.443
(a) 与 (e)	-5.725	0.000	-4.775	0.001	(c) 与 (e)	0.508	0.622	1.177	0.266
(b) 与 (c)	-3.692	0.004	-4.585	0.001	(d) 与 (e)	0.464	0.652	0.379	0.712

右侧纹状体脑出血模型并获得成功。

本研究结果显示,成年 SD 大鼠于移植 BMMSC 细胞后 28 天 mNSS 评分降低并接近对照组水平,不同处理组大鼠 mNSS 评分呈时间性递减,其中治疗后 7、14 和 28 天 mNSS 评分低于治疗后 1 和 3 天,表明 BMMSC 细胞具有神经修复功能,一般于移植治疗后 7 天即可发挥修复作用,改善大鼠行为能力,而且起效时间早于缺血性卒中,考虑可能与出血性和缺血性卒中的病理学机制不同有关,这一现象与临床事实亦相符,即出血性卒中患者的恢复周期明显短于缺血性卒中。因此,患者可以尽早开始自主功能康复训练,避免疾病晚期局限性脑萎缩或废用性肌萎缩的发生^[13]。慢性出血性卒中研究显示, BMMSC 细胞移植治疗脑出血的时间窗较长,即使发

病后 8 周开始治疗仍然有效^[14],可以弥补传统方法治疗时间窗狭窄的不足^[15]。

本研究 GFAP 和 NeuN 免疫荧光染色显示,移植组大鼠有少量神经细胞同时呈绿色和红色荧光,提示移植的 BMMSC 细胞已在宿主脑组织存活并向神经元样细胞和神经胶质样细胞分化,且在神经分化的间充质干细胞胞质可见尼氏体和神经突起^[16]。经体外培养的 BMMSC 细胞可分化为神经元样细胞,表达 NeuN^[17]、巢蛋白(Nes)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)和 GFAP^[18],但本研究移植组大鼠显微镜下仅可于血肿区见到极少量分化存活的细胞且神经元样细胞稀疏,证实单纯干细胞的替代作用并不足以显著改善神经功能^[19],目前更倾向于 BMMSC 细胞是通过上调神经营养因子的表达^[18-20]、增强神经保护作用^[7,10,21-25]、下调炎性因子表达等作用机制而发挥其损伤修复作用,改善大鼠行为学表现^[8]。BMMSC 细胞可分泌多种神经营养因子,如神经生长因子(NGF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)和 BDNF 等^[20],笔者认为 BDNF 在其中发挥主要作用。BDNF 是一种广泛分布于中枢神经系统的蛋白质,具有以下功能:(1)参与神经元的生长、分化和存活过程,防止神经细胞死亡、促进神经细胞再生和分化,通过调节 Bcl-2、Bax 蛋白表达而抑制细胞凋亡,对局部脑组织损伤发挥修复作用,阻止凝血酶自损伤的脑组织释放入血^[21]。(2)稳定脑组

织损伤后的钙离子表达变化,增强抗氧化酶活性,减轻自由基损伤,促进神经元再生、神经功能恢复。研究显示,缺血缺氧等病理改变均可下调脑组织 BDNF mRNA 和蛋白表达水平,从而抑制大鼠空间学习和记忆能力,与本研究结果相一致^[26]。(3)具有抗炎反应^[27]、减轻神经元树突萎缩作用,与神经元功能重塑相关^[27-29]。(4)BDNF 基因编码修饰的神经干细胞研究显示,移植此类干细胞后,损伤部位 *TrkB* 基因、*p-TrkB* 基因、*RAS* 基因和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(*p-ERK1/2*) 基因表达上调, BDNF 与 *TrkB* 受体结合使酪氨酸残基二聚体磷酸化形成结合位点,激活 *RAS* 蛋白和丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK)/ERK1/2 信号转导通路,促进移植细胞和宿主细胞的存活及突起的生长和分化^[28]。(5)BDNF 表达水平升高可激活 Nrf2/抗氧化反应元素 (ARE) 信号转导通路,参与脑组织损伤和神经退行性变后的抗氧化反应;而 Nrf2/ARE 信号转导通路具有激活抗氧化酶合成的作用,可在脑组织损伤后发挥神经功能保护作用,这一作用主要通过 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽还原酶 (GR) 和硫氧还蛋白 (Trx) 还原酶等在 Nrf2/ARE 信号转导通路调控转录过程中起主要作用的蛋白质来完成。(6)BDNF 过表达可显著上调突触后致密物 95 (PSD95) 的表达,后者为谷氨酸成熟突触的主要骨架蛋白,对突触强度和可塑性起重要作用。抗氧化剂硫氧还蛋白可以增强神经元对功能障碍和变性的抵抗能力,由神经生长因子经 ERK 级联反应促进神经发生,修复认知功能。因此,MAPK/ERK 信号转导通路的激活可以增强 Nrf2/Trx 信号转导通路,并上调突触后 PSD95 的表达,参与大脑皮质突触发育过程中谷氨酸能突触的稳定,促进谷氨酸能突触的发生,从而增强突触传递效能,改善学习和记忆能力。(7)相对于严重缺血性卒中,脑出血后血肿周围脑组织呈轻至中度低灌注,故细胞凋亡成为血肿周围神经细胞死亡的主要形式,同时,缺血-再灌注产生的氧自由基可进一步促进 DNA 损伤和细胞凋亡^[30]。而 BDNF 可调节自由基代谢功能,经体外培养的神经元 BDNF 可提高超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 表达水平,减少自由基,进而减轻细胞凋亡^[27,29-30]。(8)既往研究已证实,BMMSC 细胞的营养和免疫调节作用有利于维持血-脑屏障 (BBB) 的完整性,降低干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子的表达,增加

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、白细胞介素-10 (IL-10) 等抗炎性因子的表达^[31],上述细胞因子与 BDNF 协同作用可减少细胞凋亡^[8,30-31],与本研究结果相一致。BMMSC 细胞分泌的血管内皮生长因子 (VEGF) 和 BDNF 与细胞膜受体相互作用,磷酸化蛋白激酶 B、激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR),最终促进血管生成和神经发生^[23],增加局部脑血流量 (rCBF),改善缺血缺氧状态^[24]。(9)移植的 BMMSC 细胞还可通过亲胆碱能神经元因子-信号传导与转录激活因子 3 (CNTF-STAT3) 完成形态重塑,抑制炎症反应,减少瘢痕形成,抑制细胞凋亡^[10]。故 BMMSC 细胞神经保护作用可能与磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/AKT 和 ERK1/2 信号转导通路相关^[7]。

脑出血和脑缺血动物模型研究证实,BMMSC 细胞移植治疗有效,主因移植后微环境和相关神经因子发挥调控作用,但其在临床上的应用尚不完善。Suárez-Monteagudo 等^[32]对脑出血患者 BMMSC 细胞移植的安全性进行观察,5 例患者均于发病后 12 个月接受血肿周围自体 BMMSC 细胞移植治疗,经 1 年随访,5 例患者均显示出良好的耐受性且未发生移植相关并发症;Li 等^[33]观察 100 例自体骨髓单核细胞移植治疗的脑出血病例,发现术后患者神经功能均有不同程度改善,随访 6 个月无一例发生移植相关并发症;Bhasin 等^[34]经鞘内注射自体 MSCs 细胞治疗脑卒中患者,术后 24 例患者,尤其是青年和发病时间较短的患者运动功能改善,且无明显不良反应,治疗后随访 6 个月至 4.5 年,所有患者神经功能均完全恢复;Zhu 等^[13]的观察结果也支持鞘内注射 BMMSC 细胞治疗脑出血安全、有效的结论。

本研究采用右侧纹状体注射 BMMSC 细胞的方法治疗 VII 型胶原酶诱导的脑出血大鼠模型,结果表明,BMMSC 细胞移植治疗可上调 BDNF 表达水平、减少细胞凋亡,由此而缓解模型大鼠神经功能缺损程度、改善其行为功能。尽管目前 BMMSC 细胞移植治疗脑出血仍存在细胞培养困难、提纯纯度较低、临床研究较少等诸多问题,但是综合各种研究成果,BMMSC 细胞移植仍为我们打开了一条治疗脑出血的新思路,尚待不断努力探索。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Morgenstern LB, Hemphill JC 3rd, Anderson C, Becker K, Broderick JP, Connolly ES Jr, Greenberg SM, Huang JN, MacDonald RL, Messé SR, Mitchell PH, Selim M, Tamargo RJ;

- American Heart Association Stroke Council and Council on Cardiovascular Nursing. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2010, 41:2108-2129.
- [2] Law ZK, Appleton JP, Bath PM, Sprigg N. Management of acute intracerebral haemorrhage: an update [J]. *Clin Med (Lond)*, 2017, 17:166-172.
- [3] Siaw-Debrah F, Nyanzu M, Ni H, Lin X, Xu Z, Ruan L, Zhuge Q, Huang L. Preclinical studies and translational applications of intracerebral hemorrhage[J]. *Biomed Res Int*, 2017:ID5135429.
- [4] Guha R, Boehme A, Demel SL, Li JJ, Cai X, James ML, Koch S, Langefeld CD, Moomaw CJ, Osborne J, Sekar P, Sheth KN, Woodrich E, Worrall BB, Woo D, Chaturvedi S. Aggressiveness of care following intracerebral hemorrhage in women and men [J]. *Neurology*, 2017, 89:349-354.
- [5] Liang H, Yin Y, Lin T, Guan D, Ma B, Li C, Wang Y, Zhang X. Transplantation of bone marrow stromal cells enhances nerve regeneration of the corticospinal tract and improves recovery of neurological functions in a collagenase-induced rat model of intracerebral hemorrhage[J]. *Mol Cells*, 2013, 36:17-24.
- [6] Bao XJ, Liu FY, Lu S, Han Q, Feng M, Wei JJ, Li GL, Zhao RC, Wang RZ. Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and anti-inflammatory and angiogenesis effects in an intracerebral hemorrhage rat model[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31:1087-1096.
- [7] Cui J, Cui C, Cui Y, Li R, Sheng H, Jiang X, Tian Y, Wang K, Gao J. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation increases GAP-43 expression via ERK1/2 and PI3K/Akt pathways in intracerebral hemorrhage[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42:137-144.
- [8] Mathew B, Poston JN, Dreixler JC, Torres L, Lopez J, Zelkha R, Balyasnikova I, Lesniak MS, Roth S. Bone marrow mesenchymal stem cell administration significantly improves outcome after retinal ischemia in rats [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2017, 255:1581-1592.
- [9] Akhoundzadeh K, Vakili A, Sameni HR, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Safari M, Mohammadkhani R. Effects of the combined treatment of bone marrow stromal cells with mild exercise and thyroid hormone on brain damage and apoptosis in a mouse focal cerebral ischemia model[J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32:1267-1277.
- [10] Xiong LL, Liu F, Lu BT, Zhao WL, Dong XJ, Liu J, Zhang RP, Zhang P, Wang TH. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation promotes functional improvement associated with CNTF-STAT3 activation after hemi-sectioned spinal cord injury in tree shrews[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11:172.
- [11] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Stroke*, 1990, 21:801-807.
- [12] Wu D, Yang J, Zhang G, Jiang H. Noninvasive in vivo monitoring of collagenase induced intracerebral hemorrhage by photoacoustic tomography [J]. *Biomed Opt Express*, 2017, 8:2276-2286.
- [13] Zhu J, Xiao Y, Li Z, Han F, Xiao T, Zhang Z, Geng F. Efficacy of surgery combined with autologous bone marrow stromal cell transplantation for treatment of intracerebral hemorrhage [J]. *Stem Cells Int*, 2015:ID318269.
- [14] Tsang KS, Ng CP, Zhu XL, Wong GK, Lu G, Ahuja AT, Wong KS, Ng HK, Poon WS. Phase I/II randomized controlled trial of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for chronic stroke[J]. *World J Stem Cells*, 2017, 9:133-143.
- [15] Sharma A, Sane H, Gokulchandran N, Khopkar D, Paranjape A, Sundaram J, Gandhi S, Badhe P. Autologous bone marrow mononuclear cells intrathecal transplantation in chronic stroke [J]. *Stroke Res Treat*, 2014:ID234095.
- [16] Rao SR, Subbarayan R, Dinesh MG, Arumugam G, Raja ST. Differentiation of human gingival mesenchymal stem cells into neuronal lineages in 3D bioconjugated injectable protein hydrogel construct for the management of neuronal disorder[J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48:E209.
- [17] Sun J, Wei ZZ, Gu X, Zhang JY, Zhang Y, Li J, Wei L. Intranasal delivery of hypoxia-preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced regenerative effects after intracerebral hemorrhagic stroke in mice [J]. *Exp Neurol*, 2015, 272:78-87.
- [18] Liu Q, Cheng G, Wang Z, Zhan S, Xiong B, Zhao X. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into nerve-like cells in vitro after transfection with brain-derived neurotrophic factor gene[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51:319-327.
- [19] Brock JH, Graham L, Staufenberg E, Collyer E, Koffler J, Tuszynski MH. Bone marrow stromal cell intraspinal transplants fail to improve motor outcomes in a severe model of spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2016, 33:1103-1114.
- [20] Zheng Y, Huang C, Liu F, Lin H, Yang X, Zhang Z. Comparison of the neuronal differentiation abilities of bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16:3877-3886.
- [21] Lu H, Liu X, Zhang N, Zhu X, Liang H, Sun L, Cheng Y. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor and noggin-modified bone mesenchymal stem cells in focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25:410-418.
- [22] Deng QJ, Xu XF, Ren J. Effects of SDF-1/CXCR4 on the repair of traumatic brain injury in rats by mediating bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38:467-477.
- [23] Zhang Q, Zhao Y, Xu Y, Chen Z, Liu N, Ke C, Liu B, Wu W. Sodium ferulate and n-butylidenephthalate combined with bone marrow stromal cells (BMSCs) improve the therapeutic effects of angiogenesis and neurogenesis after rat focal cerebral ischemia [J]. *J Transl Med*, 2016, 14:223.
- [24] Feng Y, Ju Y, Cui J, Wang L. Bone marrow stromal cells promote neuromotor functional recovery, via upregulation of neurotrophic factors and synapse proteins following traumatic brain injury in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16:654-660.
- [25] Peng RJ, Jiang B, Ding XP, Huang H, Liao YW, Peng G, Cheng Q, Xi J. Effect of TNF- α inhibition on bone marrow-derived mesenchymal stem cells in neurological function recovery after spinal cord injury via the Wnt signaling pathway in a rat model [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42:743-752.
- [26] Guo YC, Song XK, Xu YF, Ma JB, Zhang JJ, Han PJ. The expression and mechanism of BDNF and NGB in perihematomal tissue in rats with intracerebral hemorrhage [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21:3452-3458.
- [27] Chen T, Wu Y, Wang Y, Zhu J, Chu H, Kong L, Yin L, Ma H. Brain-derived neurotrophic factor increases synaptic protein levels via the MAPK/Erk signaling pathway and Nrf2/Trx axis following the transplantation of neural stem cells in a rat model of traumatic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42:3073-3083.
- [28] Takamatsu Y, Tamakoshi K, Waseda Y, Ishida K. Running exercise enhances motor functional recovery with inhibition of dendritic regression in the motor cortex after collagenase-

- induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Behav Brain Res, 2016, 300:56-64.
- [29] Zhong JB, Li X, Zhong SM, Liu JD, Chen CB, Wu XY. Knockdown of long noncoding antisense RNA brain - derived neurotrophic factor attenuates hypoxia/reoxygenation - induced nerve cell apoptosis through the BDNF - TrkB - PI3K/Akt signaling pathway[J]. Neuroreport, 2017, 28:910-916.
- [30] Ahn SY, Chang YS, Sung DK, Sung SI, Ahn JY, Park WS. Pivotal role of brain - derived neurotrophic factor secreted by mesenchymal stem cells in severe intraventricular hemorrhage in newborn rats[J]. Cell Transplant, 2017, 26:145-156.
- [31] Zhang R, Yang J, Yuan J, Song B, Wang Y, Xu Y. The therapeutic value of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation after intracerebral hemorrhage in rats [J]. Front Neurol, 2017, 8:174.
- [32] Suárez-Monteagudo C, Hernández-Ramírez P, Alvarez-González L, García-Maeso I, de la Cuétara-Bernal K, Castillo-Díaz L, Bringas - Vega ML, Martínez - Aching G, Morales - Chacón LM, Búez - Martín MM, Sánchez - Catasús C, Carballo - Barreda M, Rodríguez - Rojas R, Gómez - Fernández L, Alberti - Amador E, Macías - Abraham C, Balea ED, Rosales LC, Del Valle Pérez L, Ferrer BB, González RM, Bergado JA. Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients: an open study [J]. Restor Neurol Neurosci, 2009, 27:151-161.
- [33] Li ZM, Zhang ZT, Guo CJ, Geng FY, Qiang F, Wang LX. Autologous bone marrow mononuclear cell implantation for intracerebral hemorrhage: a prospective clinical observation[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2013, 115:72-76.
- [34] Bhasin A, Srivastava MV, Kumaran SS, Mohanty S, Bhatia R, Bose S, Gaikwad S, Garg A, Airan B. Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke[J]. Cerebrovasc Dis Extra, 2011, 1: 93-104.

(收稿日期:2019-09-07)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(四)

- 胎盘碱性磷酸酶 placental alkaline phosphatase(PLAP)
- T₂*-梯度回波序列 T₂*-gradient echo sequence(T₂*-GRE)
- 同型半胱氨酸 homocysteine(Hcy)
- 突触后致密物 95 post synaptic density 95(PSD95)
- ¹⁸F-脱氧葡萄糖 ¹⁸F-fluoro-2-deoxy-D-glucose(¹⁸F-FDG)
- 微创术与重组组织型纤溶酶原激活物联合清除颅内出血研究
Minimally-Invasive Surgery plus rt-PA for Intracerebral Hemorrhage Evacuation (MISTIE) study
- 无事件生存率 event-free survival(EFS)
- 系统性红斑狼疮 systemic lupus erythematosus(SLE)
- 细胞角蛋白 cytokeratin(CK)
- 细胞色素 C 氧化酶 cytochrome C oxidase(COX)
- 细胞外信号调节激酶
extracellular signal-regulated kinase(ERK)
- 线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作
mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidemia and stroke-like episodes(MELAS)
- 线性判别分析 linear discriminant analysis(LDA)
- 虚拟现实 virtual reality(VR)
- 血管内皮生长因子
vascular endothelial growth factor(VEGF)
- 血管内治疗 endovascular treatment(EVT)
- 血管周围间隙 perivascular spaces(PVS)
[Virchow-Robin 间隙 Virchow-Robin spaces(VRS)]
- 一氧化氮合酶 nitric oxide synthase(NOS)
- 一致性相关系数 concordance correlation coefficient(CCC)
- 遗传性包涵体肌病
hereditary inclusion body myopathy(hIBM)
- Leber 遗传性视神经病
Leber's hereditary optic neuropathy(LHON)
- 异硫氰酸荧光素 fluorescein isothiocyanate(FITC)
- 游离 T₃ free triiodothyronine(FT₃)
- 游离 T₄ free thyroxine(FT₄)
- Glasgow 预后分级 Glasgow Outcome Scale(GOS)
- 藻红蛋白 phycoerythrin(PE)
- 增强现实 augmented reality(AR)
- 增强移动宽带 enhanced mobile broadband(eMBB)
- 支持向量机 support vector machine(SVM)
- Barthel 指数 Barthel Index(BI)
- 肿瘤坏死因子-α tumor necrosis factor-α(TNF-α)
- 重型颅脑创伤 severe traumatic brain injury(sTBI)
- 重症监护病房 intensive care unit(ICU)
- 蛛网膜下腔出血 subarachnoid hemorrhage(SAH)
- 转化生长因子-β transforming growth factor-β(TGF-β)
- 总胆固醇 total cholesterol(TC)
- 最大密度投影 maximum intensity projection(MIP)
- K 最近邻 K-nearest neighbor(KNN)