

亚低温与脑缺血大鼠骨髓间充质干细胞的迁移

游 辉¹, 彭 玉¹, 张其梅¹, 李承晏²

Mild hypothermia effects on migration of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with cerebral ischemia

You Hui¹, Peng Yu¹, Zhang Qi-mei¹, Li Cheng-yan²

Abstract

BACKGROUND: There are a few reports addressing application of mild hypothermia to the study of repairing nerve injury, but few reports have addressed mild hypothermia effects on migration of neural stem cells in the brain following transplantation.

OBJECTIVE: To explore the effects of mild hypothermia on migration of BMSCs transplanted into lateral ventricle of rats after cerebral ischemia.

METHODS: A focal cerebral ischemic injury model of right middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established using modified Longa's method in Sprague Dawley rats. Local mild hypothermia was applied in the mild hypothermia group prior to transplantation. Normal body temperature was maintained in control group before transplantation. At 24 hours following model establishment, BMSCs labeled with 5-BrdU were transplanted into the rat lateral ventricle under brain stereotaxis. The amount of BrdU-positive cells was measured by immunohistochemistry at 5, 14, 21, 28 days and 7 weeks following injection in each group.

RESULTS AND CONCLUSION: At 14 days after transplantation, a majority of labeled BMSCs had migrated to the infarct area. At various time points following transplantation, the number of BrdU-positive cells was obviously greater in the hypothermia group compared with the control group ($P < 0.05$). Results have indicated that mild hypothermia may promote the migration of BMSCs, and shows neuroprotective effects on focal cerebral ischemia.

You H, Peng Y, Zhang QM, Li CY. Mild hypothermia effects on migration of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with cerebral ischemia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(32): 5931-5934.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 关于亚低温运用到神经损伤修复领域的研究已有一些报道, 但亚低温对神经干细胞在脑内移植迁移的影响还不太清楚。

目的: 观察亚低温对移植入脑缺血大鼠侧脑室的骨髓间充质干细胞迁移的影响。

方法: 采用 Longa 法永久性闭塞 SD 大鼠大脑中动脉制作局灶性脑缺血损伤模型, 亚低温组于移植前应用亚低温处理大鼠急性脑缺血损伤, 对照组于移植前应用常温处理大鼠急性脑缺血损伤; 造模术后 24 h, 在脑立体定向下, 经侧脑室注射移植用 5-BrdU 标记的骨髓间充质干细胞。经过 5, 14, 21, 28 d, 7 周后用免疫组织化学方法检测各组大鼠脑组织 BrdU 阳性细胞数。

结果与结论: 移植第 14 天多数标记的骨髓基质细胞已经迁移至梗死灶周围, 移植后各时间点亚低温组梗死灶周边皮质的 BrdU 阳性细胞数明显多于对照组 ($P < 0.05$)。提示移植前宿主亚低温处理可以促进骨髓间充质细胞的定向迁移, 对局灶性脑缺血有神经保护作用。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 亚低温; 迁移; 脑缺血; 移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.32.009

游辉, 彭玉, 张其梅, 李承晏. 亚低温与脑缺血大鼠骨髓间充质干细胞的迁移[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32):5931-5934. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

研究表明骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是具有多向分化潜能的多能干细胞, 常被作为种子细胞用于细胞移植。大量动物实验证实, BMSCs 经脑实质移植、血液内移植和脑脊液内移植后, 移植的干细胞在脑缺血损伤诱导下可朝缺血灶区定向迁移, 均可到达病灶部位, 并分化成神经干细胞、成熟神经元和胶质细胞, 可有效改善神经功能^[1-2], 但其确切治疗机制尚未完全阐明。

近年来, 有关亚低温(32~35 °C)对神经元保护作用的研究很多^[3-4], 并有研究表明亚低温可促进大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧脑组织内源性神经干细胞的进一步增殖^[5]。本实验采用大鼠局灶性脑缺血模型, 观察亚低温对植入侧脑室的BMSCs迁移影响。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2006-03/2007-10在武汉大学人民医院神经科实验室和丝宝药业有限公司博士后科研工作站完成。

¹First Clinical Medical College, Three Gorges University, Yichang 443003, Hubei Province, China; ²Department of Neurology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

You Hui, Attending physician, First Clinical Medical College, Three Gorges University, Yichang 443003, Hubei Province, China

Correspondence to: Peng Yu, Master, Attending physician, First Clinical Medical College, Three Gorges University, Yichang 443003, Hubei Province, China
yctpengu@126.com

Received: 2010-03-22
Accepted: 2010-05-18

¹ 三峡大学第一临床医学院, 湖北省宜昌市 443003; ² 武汉大学人民医院神经科, 湖北省武汉市 430070

游辉, 湖北省麻城市人, 汉族, 主治医师, 主要从事干细胞治疗方面的研究。

通讯作者: 彭玉, 硕士, 主治医师, 三峡大学第一临床医学院, 湖北省宜昌市 443003
yctpengu@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)32-05931-04

收稿日期: 2010-03-22
修回日期: 2010-05-18
(20100322006/M · Q)

材料:

实验动物: 50只SPF级SD大鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 体质量(180±20)g, 2月龄, 雌雄不拘, 随机分为亚低温组20只, 对照组20只, 假手术组10只。实验过程中对动物处置符合科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求^[6]。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清、DMEM/F12 培养液、Hank's 液、0.25%胰酶、V 型胶原酶	Gibco 公司, 美国
L-谷氨酰胺、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶(1:250)	Hyclone 公司, 美国
5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU), 小鼠抗大鼠 BrdU	Sigma 公司, 美国
DAB 显色试剂盒、SABC 试剂盒	北京中山生物有限公司
Percoll 密度梯度淋巴细胞分离液	上海试剂二厂
Olympus 倒置相差显微镜	Olympus 公司, 日本
I-C 型立体定位仪	上海江湾医用仪器厂

实验方法:

BMSCs的分离、培养: 随机取4只SD大鼠麻醉后脱颈处死, 消毒后取双侧股骨, 自中间剪断后用DMEM冲洗骨髓腔, 将所获骨髓研磨成组织匀浆, 120目铜网过滤, 缓慢加入含Ficoll-Paque分离液的试管内梯度离心, 吸取含粒细胞中间界面层, 加PBS吹打离心, 弃上清, 重复洗涤1次, 弃上清, 加入DMEM培养基5 mL, 用吸管反复吹打成单细胞悬液^[7]。加入含体积分数为20%胎牛血清的完全培养液于37℃、体积分数为5%CO₂饱和湿度孵育箱内培养, 24 h后首次换液, 以后每两三天换液1次去除未贴壁细胞, 七八天传代1次^[8]。倒置相差显微镜观察, 第5代后细胞形态为均一的纺锤形细胞, 可形成均匀的集落。第5代BMSCs用胰酶消化后, 搜集细胞悬液, 离心, 活细胞计数调细胞浓度为3×10⁹L⁻¹, 供移植用。

体外BrdU标记BMSCs: 传到第3代时加入10 g/L BrdU储存液, 使其终浓度为5 μmol/L, 24 h换液, 调细胞浓度为5×10⁸L⁻¹备用, 48 h后用亨氏液反复清洗细胞3次, 准备染色和移植。

大鼠局灶性脑缺血模型(MCAO)的建立和亚低温处理: 采用Longa法栓塞右侧大脑中动脉制作大鼠局灶性脑缺血损伤模型^[9], 大鼠10%水合氯醛腹腔注射麻醉后, 常规消毒备皮, 取颈正中切口, 分离右侧颈总动脉, 结扎颈外动脉, 将头端烧成直径约0.3 mm圆头的4-0号黑色尼龙线从颈总动脉插入18~21 cm, 阻断大脑中动脉的血流, 造成大脑中动脉供血区永久性缺血。假手术组直接结扎右侧颈总动脉, 插入线栓1.0 cm。待大鼠苏醒后依据Zea longa 5分制标准筛选出2分或3分的脑缺血模型

进入移植实验。0分: 无神经功能缺损症状, 活动正常; 1分: 不能伸展对侧前爪; 2分: 爬行时出现向左转圈; 3分: 行走时身体向偏瘫侧倾倒; 4分: 不能自行行走, 意识丧失。亚低温组脑缺血后立即将大鼠置于温控环境中诱导亚低温, 时间约为30 min, 并使大鼠肛温稳定控制在(34±1)℃, 持续约24 h直至移植前自然复温至正常体温。对照组和假手术组于移植前应用常温处理大鼠急性脑缺血损伤。

细胞移植实验: 脑缺血亚低温处理24 h后, 大鼠麻醉、固定, 切开头顶皮肤, 用脑立体定位仪固定大鼠头部, 参照大鼠脑定向图谱^[10], 于前囟后0.8 mm, 矢状缝左侧1.5 mm, 颅骨下4.0 mm, 用牙科钻在颅顶钻一直径约1.0 mm的圆孔, 用微量注射针头经此圆孔垂直刺入左侧侧脑室, 缓慢推注20 μL(5×10⁵) BMSCs细胞悬液, 留针10 min后缓慢拔针防止细胞外溢。动物清醒后送笼喂养观察。

脑组织切片的制备: 移植5, 14, 21, 28 d, 7周后各组大鼠经腹腔注射10%水合氯醛麻醉后, 40 g/L多聚甲醛进行心脏灌注, 取脑后, 放于40 g/L的多聚甲醛溶液中固定24 h。常规脱水、透明、石蜡包埋。选择含梗死灶中心部位脑组织连续冠状切片, 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BrdU阳性细胞免疫组化检测。

免疫组织化学染色: 组织石蜡切片经常规脱蜡水化后, 采用免疫组织化学染色法分别进行染色。操作严格按说明书进行, 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。每张免疫组化染色的切片随机选取含梗死灶中心区域的5个不重复高倍视野(放大400倍), 分别计算阳性细胞数。

主要观察指标: BrdU阳性细胞免疫组化染色结果。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一、二作者, 实施和评估由全体作者共同完成。

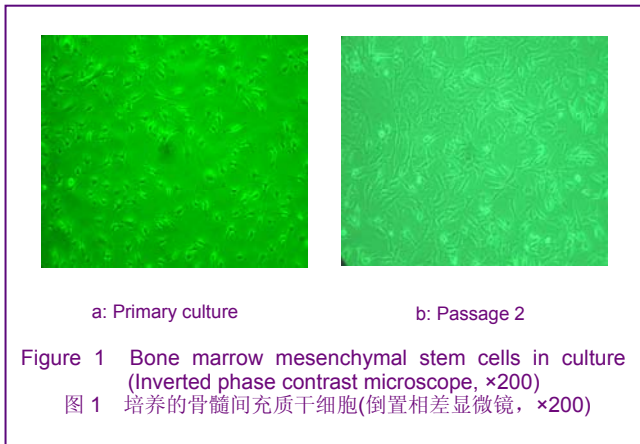
统计学分析: 全部资料采用SPSS 10.0统计软件包进行统计分析, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 记录。比较相同时间点各组间BrdU阳性细胞数, 两组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.01为差异有显著性意义。

2 结果

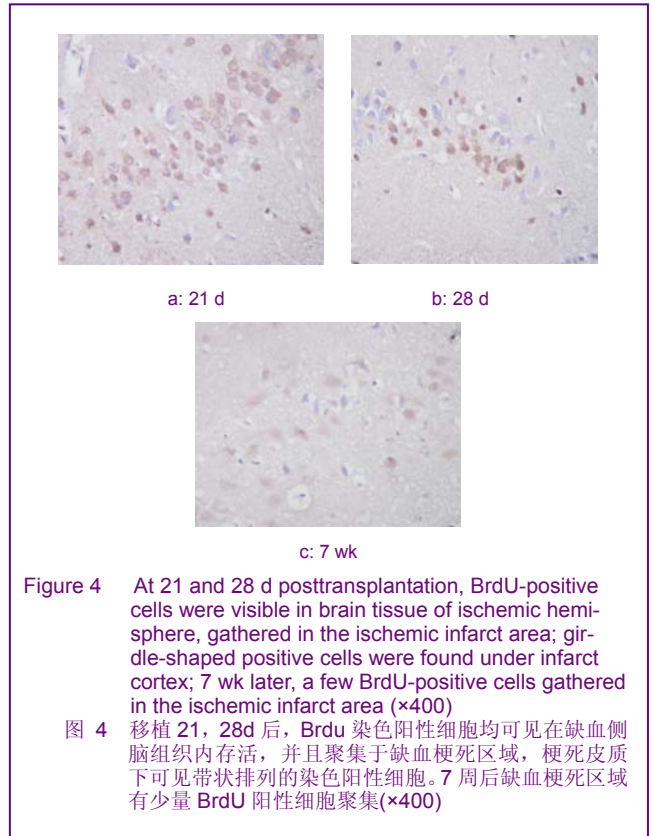
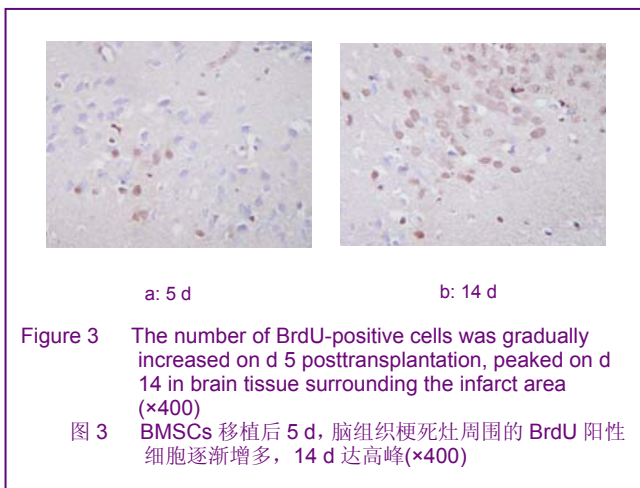
2.1 实验动物数量分析 右侧大脑中动脉缺血模型因麻醉过量死亡2只, 移植后感染死亡2只, 予补足。用于体内实验的50只大鼠均进入结果分析, 中途无脱失。

2.2 经原代、传代培养的BMSCs形态 原代培养的骨髓间充质干细胞呈圆形, 贴壁后大部分细胞呈梭形, 并带有两三个长的突起, 细胞核较大, 扁圆形, 少部分细胞呈不规则形, 胞浆可向不同方向伸出突起, 细胞集落间相互融合成单层, 排列具有一定方向性。成集落样生长, 胞体透亮, 折光性好; 传代1次呈均匀分布, 融合

成片, 见图1。体外BrdU标记的细胞免疫组化染色示核为棕色, 见图2。



2.3 组织切片BrdU染色分析 各组切片的免疫组化染色结果良好。BrdU阳性反应物呈棕褐色、颗粒状或弥漫性分布, 位于细胞核内; BMSCs移植后5 d, 脑组织梗死灶周围的BrdU阳性细胞逐渐增多, 至移植14 d达高峰, 见图3。在移植21, 28 d后, BrdU染色阳性细胞均可见在缺血侧脑组织内存活, 并且聚集于缺血梗死区域, 梗死皮质下可见带状排列的染色阳性细胞, 7周后缺血梗死区域有少量BrdU阳性细胞聚集, 见图4。



假手术组未见BrdU染色阳性细胞, 见图5。



2.4 各时间点梗死灶周边皮质BrdU阳性细胞数 见表1。

表1 各时间点梗死灶周边皮质 BrdU 阳性细胞数
Table 1 The number of BrdU-positive cells in the cortex around infarction focus at different time points (x±s, n=4, /400-fold visual field)

Group	n	Time following bone marrow mesenchymal stem cells transplanted into the lateral ventricle of healthy hemisphere				
		5 d	14 d	21 d	28 d	7 wk
10		-	-	-	-	-
20		1.5±1.6	10.3±2.1	87.3±5.1	95.6±4.1	102.5±2.1
20		5.3±1.8 ^a	21.8±1.7 ^a	128.6±4.8 ^a	169.2±1.8 ^a	180.0±1.8 ^a

^aP < 0.05, vs. control group at the same time point

由表1可见, 假手术组未见BrdU阳性细胞, 亚低温组各时间点梗死灶周边皮质的BrdU阳性细胞数明显多于对照组($P < 0.01$)。

3 讨论

骨髓间充质干细胞有多向分化潜能, 在特定环境下可分化为神经元和星形胶质细胞, 并增加脑源性神经营养因子、血管内皮生长因子等表达从而减少缺血半暗带的细胞凋亡, 改善局部脑血液循环, 有助于突触重建^[11-12], 参与修复缺损的神经功能^[13]。许多研究者通过脑室、静脉、动脉等途径将BMSCs移植到局灶性脑缺血动物体内, 发现移植细胞能向缺血损伤中心区域不断迁移、聚集^[14]。干细胞向缺血损伤区定向迁移的机制较复杂, 主要与营养因素、代谢因素、细胞周围微环境、分泌因素如神经营养因子等有关^[15]。因晚期移植面临继发性脑萎缩等问题, 目前多倾向于急性期移植^[16]。但脑缺血急性期, 由于渗出、水肿、变性、坏死等病理变化过程中组织会释放一些神经毒性物质, 如自由基、炎性因子、兴奋性神经递质等, 这些神经毒性物质会威胁到进入缺血区新生细胞的存活^[17]; 急性期缺血诱导产生的神经营养因子浓度较低也会影响干细胞的存活和定向迁移。研究提示亚低温对脑缺血后神经元有确切的脑保护作用, 它不但能降低脑部代谢, 还能抑制氧自由基、钙超载形成, 减轻缺血再灌注后炎症反应, 上调抑凋亡基因及下调促凋亡基因来发挥其抗缺血半暗带的损伤神经细胞凋亡作用, 并能促进神经营养因子释放。因此亚低温可能通过改变脑缺血损伤后的微环境影响干细胞的定向迁移。

本实验采用立体定向法, 将同种异体大鼠骨髓间质干细胞移植到亚低温处理后的局灶性脑缺血模型大鼠健侧侧脑室, 观察迁移到梗死灶周的细胞数目, 探讨亚低温在干细胞移植治疗中的意义。BrdU 是DNA前体胸腺嘧啶核苷酸的类似物, 在细胞周期S期它可与内源性胸腺嘧啶核苷竞争掺入DNA 中, 并随标记细胞增殖传代。只要细胞存活, 掺入的BrdU在细胞核的DNA中永久存留。本实验用BrdU标记来“跟踪”体外分离、纯化培养SD大鼠股骨间充质干细胞, 采用脑立体定向移植到病灶对侧侧脑室。在移植10 d后, 亚低温组及常温对照组免疫组化结果可以看到经脑脊液循环迁移到皮质、皮质下脑损伤区呈散在分布的BrdU(+)细胞。在移植21~28 d后, BrdU染色阳性细胞均可见在脑组织内存活, 并且聚集于缺血梗死区域, 梗死皮质下可见带状排列的染色阳性细胞。表明移植的干细胞部分存活, 并向病灶周围发生了迁移, 与部分学者所报道的结果一致。结果还提示, 亚低温组各时间点缺血侧梗死灶周边皮质的BrdU阳性细胞数均明显多于对照组($P < 0.01$)。表明

大鼠急性脑缺血损伤采用亚低温改变干细胞移植宿主的环境, 有利于干细胞迁移。其具体的机制还不清楚, 可能主要与以下因素有关: ①可减少脑缺血早期乳酸代谢产物堆积、钙超载、一氧化氮介导的细胞毒性反应、减少兴奋性氨基酸、自由基等内源性毒性产物的产生等, 有利于移植物的存活和生长。②亚低温可增加缺血损伤所诱导产生的细胞因子如脑源性神经营养因子、神经生长因子等的浓度, 有利于移植的干细胞系存活、增殖和迁移。③可调节机体应激反应产生的与干细胞增殖有关的细胞因子活性和基因水平, 有利于细胞移植存活、增殖, 进而增加迁移的细胞数。

4 参考文献

- [1] Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, et al. Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2007;24(6):1026-1036.
- [2] Zhang C, Li Y, Chen J, et al. Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience*. 2006;141(2):687-695.
- [3] Pabello NG, Tracy SJ, Keller RW Jr. Protective effects of brief intra- and delayed postischemic hypothermia in a transient focal ischemia model in the neonatal rat. *Brain Res*. 2004;995(1):29-38.
- [4] Wu GX, Li CY, Li T, et al. *Zhonghua Wuli Yixue yu Kangfu Zazhi*. 2002;24(10):605-607.
吴国祥, 李承晏, 李涛, 等. 亚低温对大鼠脑缺血再灌注损伤后Bcl-2和c-fos蛋白表达及损伤神经细胞凋亡的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24(10):605-607.
- [5] Wu GX, Li CY, Liu CY, et al. *Zhonghua Wuli Yixue yu Kangfu Zazhi*. 2006;28(8):515-517.
吴国祥, 李承晏, 刘春英, 等. 亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后神经干细胞增殖的动态变化[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(8):515-517.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [7] Marshall CT, Lu C, Winstead W, et al. The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells. *Histol Histopathol*. 2006;21(6):633-643.
- [8] Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, et al. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J Spinal Cord Med*. 2006;29(3):191-203.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.
- [10] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press. 1998.
- [11] 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 Neurosci Res*. 2003;73(6):778-786.
- [12] Li WT, Xu ZL, Ding F, et al. S100 protein expression during induced Schwann cell-like cell differentiation of rat bone marrow mesenchymal cells in vitro. *Neural Regen Res*. 2010;5(3):178-184.
- [13] Mahmood A, Lu D, Qu C, et al. Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg*. 2006;104(2):272-277.
- [14] Yang LY, Huang TH, Ma L. Bone marrow stromal cells express neural phenotypes in vitro and migrate in brain after transplantation in vivo. *Biomed Environ Sci*. 2006;19(5):329-335.
- [15] Chmielnicki E, Benraiss A, Economides AN, et al. Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci*. 2004;24(9):2133-2142.
- [16] Mattsson B, Sørensen JC, Zimmer J, et al. Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments. *Stroke*. 1997;28(6):1225-1231.
- [17] Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(5):399-415.