

骨髓间充质干细胞移植影响慢性脑缺血大鼠认知功能及海马区Nogo-A、NgR的表达*★

王燕琳, 闫禹, 宋波, 张惠莉, 龚光明, 陈思, 方慧, 许予明

Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells improves cognitive function of rats with chronic cerebral ischemia and decreases Nogo-A and NgR protein expression in the hippocampus

Wang Yan-ling, Yan Yu, Song Bo, Zhang Hui-li, Gong Guang-ming, Chen Si, Fang Hui, Xu Yu-ming

Abstract

BACKGROUND: Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells can decrease Nogo-A and NgR expression in rats with spinal cord injury and cerebral infarction.

OBJECTIVE: To investigate the effects of transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on cognitive function of rats with chronic cerebral ischemia and Nogo-A and NgR protein expression in the hippocampus.

METHODS: Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-surgery, model and bone marrow mesenchymal stem cells groups. Rats in the latter two groups were established into model of chronic cerebral ischemia by permanent ligation of bilateral common carotid artery. In the bone marrow mesenchymal stem cells group, at 7 days after chronic cerebral ischemia induction, bone marrow mesenchymal stem cells (1×10^7) isolated by ficoll density gradient centrifugation were transfused into rats via the tail vein.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with sham-surgery group, the average escape latency was significantly shortened ($P < 0.01$), the number that rats passed through the platform was significantly increased ($P < 0.05$), and Nogo-A and NgR expression in the hippocampal tissue was significantly decreased ($P < 0.05$) in the bone marrow mesenchymal stem cells group. These findings suggest that transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells protects spatial learning and memory abilities of rats with chronic cerebral ischemia. This effect is possibly related to decreased Nogo-A and NgR protein expression.

Wang YL, Yan Y, Song B, Zhang HL, Gong GM, Chen S, Fang H, Xu YM. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells improves cognitive function of rats with chronic cerebral ischemia and decreases Nogo-A and NgR protein expression in the hippocampus. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(10): 1833-1836. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞移植可降低脊髓损伤及脑梗死大鼠的 Nogo-A 及 NgR 的表达。

目的: 观察骨髓间充质干细胞移植对慢性脑缺血大鼠认知功能及海马区 Nogo-A 及 NgR 蛋白的表达。

方法: 将 30 只 SD 大鼠随机等分为假手术组、模型组及骨髓间充质干细胞组, 后 2 组采用双侧颈总动脉永久结扎法建立大鼠慢性脑缺血模型, 骨髓间充质干细胞组在建模 7 d 后尾静脉注射移植用 ficoll 密度梯度离心法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞 1×10^7 个。

结果与结论: 与假手术组比较, 模型组大鼠平均逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$), 穿过原平台位置次数明显减少($P < 0.01$), 海马中 Nogo-A 与 NgR 蛋白表达明显增加($P < 0.05$); 而与模型组比较, 骨髓间充质干细胞组大鼠平均逃避潜伏期明显缩短($P < 0.01$), 穿过原平台位置次数明显增加($P < 0.05$), 海马组织中 Nogo-A 及 NgR 表达明显减少($P < 0.05$)。说明骨髓间充质干细胞移植具有保护慢性脑缺血大鼠空间学习与记忆能力的作用, 其作用可能与降低 Nogo-A 及 NgR 蛋白表达有关。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 细胞移植; 慢性脑缺血; Nogo-A; NgR; 认知

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.10.027

王燕琳, 闫禹, 宋波, 张惠莉, 龚光明, 陈思, 方慧, 许予明. 骨髓间充质干细胞移植影响慢性脑缺血大鼠认知功能及海马区 Nogo-A、NgR 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10):1833-1836.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Third Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Wang Yan-lin★, Studying for master's degree, Third Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China 410215135@qq.com

Corresponding author: Xu Yu-ming, M.D., Professor, Doctoral supervisor, Third Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China xuyuming@zzu.edu.cn.

Supported by: the Major Program of Public Science Research of Henan Province, No. 091100910800*

Received: 2012-02-03
Accepted: 2012-02-13

0 引言

慢性脑缺血是由于各种因素造成的颈内动脉系统或椎-基底动脉系统血管痉挛、狭窄、闭塞, 脑部长期血流灌注不足, 引起组织缺血缺氧, 导致神经功能受损, 认知功能障碍^[1]。神经损伤后继发一系列病理生理变化导致大量轴突再生抑制蛋白释放, 不利于神经功能恢复^[2]。Nogo-A是目前已知的最强的轴突再生抑制蛋

白, 在髓鞘损伤后具有强烈的抑制轴突生长作用^[3], NgR是其受体, 介导神经生长抑制作用, 是影响神经修复的重要通路^[4]。有研究表明大鼠脑缺血缺氧后 Nogo-A和NgR蛋白表达均增高, 强烈抑制神经纤维的再生与联系, 导致再生能力的减退^[5]。

骨髓间充质干细胞是一种具有多向分化潜能的干细胞, 来源广泛, 易于采集、制备及保存, 避免了免疫排斥反应, 又可通过自体移植, 且不涉及社会、伦理及法律等问题, 具有广泛

郑州大学第一附属医院神经内科三科, 河南省郑州市 450052

王燕琳★, 女, 1986年生, 郑州大学在读硕士, 主要从事脑血管病的基础与临床研究。410215135@qq.com

通讯作者: 许予明, 博士, 主任, 教授, 博士生导师, 郑州大学第一附属医院神经内科三科, 河南省郑州市 450052 xuyuming@zzu.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)10-01833-04

收稿日期: 2012-02-03
修回日期: 2012-02-13
(20111229002/YJ · S)

的临床应用前景。有研究表明骨髓间充质干细胞移植可通过降低脊髓损伤模型及脑梗死模型大鼠的Nogo-A及NgR的表达, 从而减轻神经损伤^[6-7]。但其改善认知状态是否与Nogo-A及NgR的表达下调有关尚未清楚。

本实验拟通过双侧颈总动脉永久结扎法建立慢性脑缺血模型, 通过骨髓间充质干细胞移植观察大鼠的学习与记忆能力的变化, 经免疫组织化学染色检测大鼠海马区Nogo-A及NgR蛋白的表达变化, 探讨骨髓间充质干细胞移植促进慢性脑缺血大鼠认知功能恢复的机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2011-06/09在郑州大学重点实验室完成。

材料:

实验动物: SPF级SD雄性大鼠30只, 体质量250~300 g, 鼠龄12~14周, 购于郑州大学动物实验中心。清洁级动物房饲养, 光照明暗各12 h, 温度20~25 °C, 湿度45%~55%, 实验符合动物伦理学要求。

主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|--|---------------|
| DMEM-F12 培养基 | 美国 Gibco 公司 |
| BrdU | 郑州鼎国生物技术有限公司 |
| 胎牛血清 | 美国 Hyclone 公司 |
| BrdU 抗原, 羊抗兔 BrdU-FITC 抗体(1:100)、羊抗兔 NogoA 抗体(1:100)、羊抗兔 NgR 抗体(1:100) | 武汉博奥森公司 |
| SP9001 试剂盒, DAB 显色试剂盒 | 北京中杉金桥公司 |
| Morris 水迷宫 | 长沙长锦科技有限公司 |
| 流式细胞仪 | BD 公司 |
| 荧光显微镜、光学显微镜 | Olympus 公司 |
| 图像分析系统 | 北京益林苑科技有限公司 |

方法:

骨髓间充质干细胞的分离及培养: 将所有大鼠麻醉满意后, 无菌条件下分离股骨、胫骨, DMEM-F12反复冲洗骨髓腔获取细胞悬液, 采用ficollc密度梯度离心法获取单个核细胞, 于培养箱中孵育(37 °C、体积分数5%CO₂饱和湿度)过夜后去除悬浮生长的造血干细胞, 每3 d换液

1次; 细胞浓度达80%~90%时按1:2~1:3传代。流式细胞仪检测大鼠骨髓间充质干细胞表面抗原 CD34(-)、CD44(+)、CD45(-)及CD105(+)进行鉴定, 将10 mg BrdU溶于15 mL蒸馏水中, 于移植前48 h取50 μL BrdU溶液加入5 mL细胞培养液中, 避光培养48 h。移植前计数细胞, 移植细胞数约为1×10⁷。

动物分组: 大鼠随机分为假手术组, 模型组和骨髓间充质干细胞组, 每组10只。

慢性脑缺血模型制备: 模型组和骨髓间充质干细胞组禁食禁水及麻醉后取大鼠的颈部正中切口, 分离并且双重结扎大鼠双侧颈总动脉的近心端、远心端后剪断, 保持肛温37 °C。假手术组仅分离大鼠双侧颈总动脉。

骨髓间充质干细胞的移植: 骨髓间充质干细胞建模7 d后经尾静脉注入1 mL骨髓间充质干细胞单细胞悬液(含1×10⁷个细胞)。

行为学测试: 所有大鼠于建模1个月后进行Morris水迷宫试验。

定向航行试验: 共进行5 d、9个时间段游泳训练, 记录其寻找到平台时间记为逃避潜伏期, 最长限制时间为120 s, 若120 s内未找到平台, 则逃避潜伏期记为120 s。

空间探索实验: 在第5天下午记录逃避潜伏期后撤去平台, 记录其120 s内跨越原平台次数。

免疫荧光及免疫组化分析: 行为学测试后, 麻醉大鼠, 暴露心脏, 左心室插管并剪开右心耳, 经左心室灌注生理盐水及多聚甲醛固定液, 断头取脑。自视交叉后2 mm取大鼠脑组织, 石蜡包埋, 进行冠状连续切片, 每张片厚3 μm。免疫荧光染色检测BrdU、免疫组织化学染色检测Nogo-A及NgR蛋白表达, 荧光显微镜200倍视野下观察绿色荧光的为带有BrdU标记的骨髓间充质干细胞。光学显微镜下观察棕黄色颗粒为免疫阳性细胞。400倍视野下每张切片选5个视野运用图像分析系统进行吸光度分析。

苏木精-伊红染色: 取大鼠海马区组织行苏木精-伊红染色。

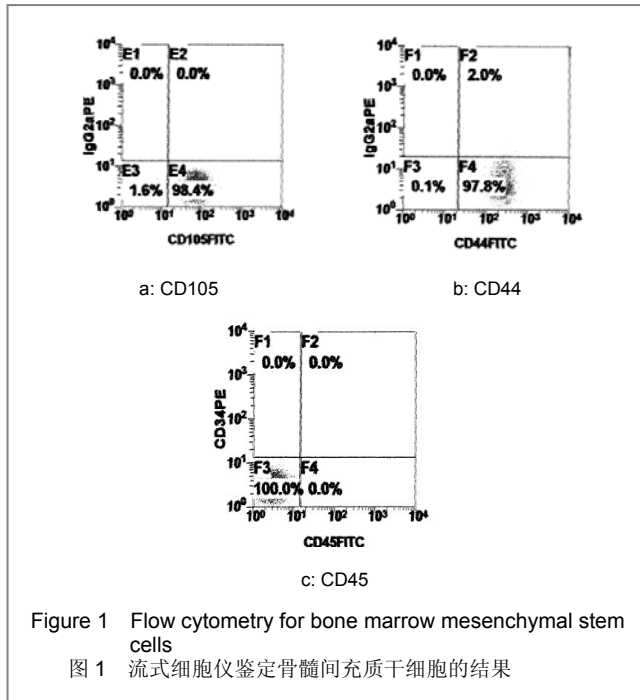
主要观察指标: Morris水迷宫法测定逃避潜伏期及跨越平台次数, 免疫组织化学染色测定大鼠脑组织海马CA1区BrdU的表达, 免疫组化法测定大鼠脑组织海马CA1区Nogo-A及NgR蛋白表达。

统计学分析: 采用SPSS 17.0软件对数据进行正态性检验和方差齐性检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较行t检验和单因素方差分析, P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 造模过程中死亡2只大鼠, 随机进行补充, 最终共有30只大鼠进入结果分析。

2.2 骨髓间充质干细胞的鉴定结果 经流式细胞仪, 所分离培养的骨髓间充质干细胞的CD105阳性率为98.4%, CD44阳性率为97.8%, CD34及CD45阴性率为100%, 纯度较高, 见图1。



2.3 大鼠Morris水迷宫检测行为学结果 模型组大鼠在定向航行试验和空间探索试验中均表现出明显的空间认知功能的障碍, 与假手术组比较, 模型组大鼠平均逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$), 跨越平台位置次数明显减少($P < 0.01$); 而与模型组比较, 骨髓间充质干细胞组大鼠平均逃避潜伏期明显缩短($P < 0.01$), 跨越平台位置次数明显增加($P < 0.05$), 见表1。

表1 大鼠Morris水迷宫检测结果
Table 1 The Morris water maze results ($\bar{x} \pm s$)

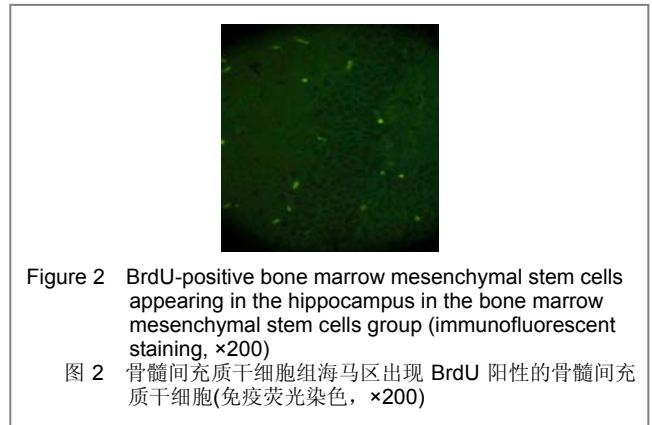
| Group | Escape latency (s) | Number that rats passed through the platform |
|------------------------------------|--------------------------|--|
| Sham-surgery | 15.20±2.15 | 7.20±1.93 |
| Model | 53.10±1.85 ^a | 2.90±1.29 ^a |
| Bone marrow mesenchymal stem cells | 32.20±1.32 ^{ab} | 4.70±1.49 ^{bc} |

^a $P < 0.01$, vs. sham-surgery group; ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, vs. model group

2.4 苏木精-伊红染色结果 模型组海马区组织苏木精-伊红染色结果显示锥形细胞排列错乱, 甚至断裂呈线状, 原有结构破坏, 大量细胞凋亡坏死及空泡形成, 骨髓间充质干细胞组海马区锥形细胞排列较乱, 但也可

见大量核深染及空泡形成, 假手术组细胞排列正常, 在病理结构上可见造模成功。

2.5 骨髓间充质干细胞能向脑缺血受损部位迁移 骨髓间充质干细胞组海马组织中观察到BrdU荧光染色阳性的骨髓间充质干细胞能向脑缺血受损部位迁移、募集、存活, 见图2。

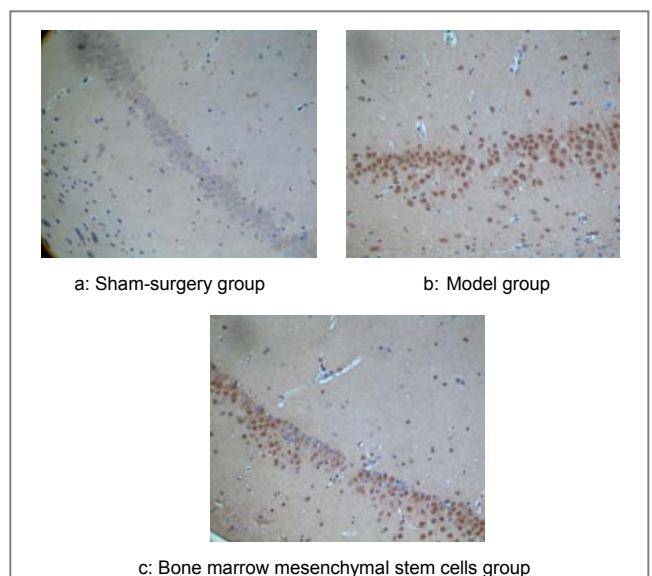


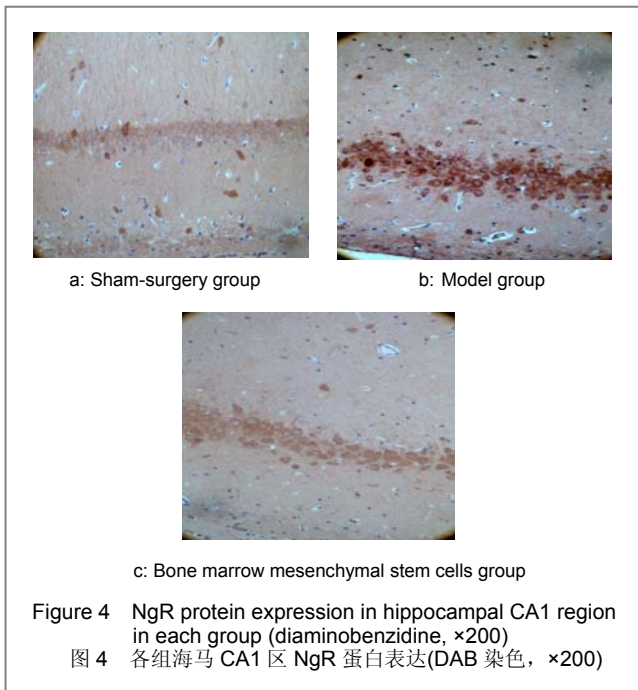
2.6 大鼠海马CA1区Nogo-A及NgR的表达 见表2, 图3, 4。

表2 各组大鼠海马区 Nogo-A 与 NgR 灰度值
Table 2 Gray value of Nogo-A and NgR in the hippocampus in each group ($\bar{x} \pm s$)

| Group | Nogo-A | NgR |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Sham-surgery | 125.50±3.02 | 115.62±4.45 |
| Model | 170.15±4.41 ^a | 178.56±7.56 ^a |
| Bone marrow mesenchymal stem cells | 145.76±3.94 ^{ab} | 136.29±3.56 ^{bc} |

^a $P < 0.01$, vs. sham-surgery group; ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, vs. model group





免疫组织化学染色显示, 各组大鼠海马CA1区神经细胞膜中均可见棕黄色颗粒, 说明均有Nogo-A及NgR表达; 模型组和骨髓间充质干细胞组大鼠海马中Nogo-A与NgR蛋白表达均比假手术组明显增加($P < 0.05$), 但相比于模型组, 骨髓间充质干细胞组海马组织中Nogo-A及NgR表达明显减少($P < 0.05$)。

3 讨论

目前已确认Nogo-A是通过p75NTR与NgR受体结合发挥抑制作用^[8]。Nogo-A与NgR-p75复合体结合后, 作用于Rho激酶-RhoA通路使RhoA水平上调, 导致生长锥体回缩, 同时降低Rac1、Cdc42水平使生长锥上丝足和伪足的收回, NgR还可使Rac1、Cdc42向RhoA转变, 进而导致生长锥的崩溃^[9]。神经损伤后应用中和性Nogo-A抗体或NgR拮抗剂, 能有效降低Nogo-A和NgR的表达, 诱导长距离轴突再生, 增加结构可塑性, 促进功能恢复^[10]。提示降低Nogo-A和NgR的表达可以促进突触再生, 减轻神经损伤, 具有神经保护功能。

本次实验结果显示, 造模30 d后, 骨髓间充质干细胞组海马区组织大鼠锥形细胞排列较为整齐, 在Morris水迷宫试验中平均逃避潜伏期缩短, 跨越平台位置次数明显增多, 学习记忆能力有所受损, 在骨髓间充质干细胞组海马组织中观察到BrdU荧光染色阳性的骨髓间充质干细胞能向脑缺血受损部位迁移、募集、存活, 提示骨髓间充质干细胞改善了慢性脑缺血大鼠的认知功能。本实验发现模型组海马区神经细胞的Nogo-A及NgR蛋白表达增加, 可能与大鼠认知功能障碍有关^[11-12]。本研究中骨髓间充质干细胞组海马区神经细胞的Nogo-A及

NgR蛋白表达较模型组减少, 提示骨髓间充质干细胞移植可能通过降低Nogo-A及NgR蛋白, 促进受损神经细胞轴突再生, 进而发挥改善认知功能的作用。而骨髓间充质干细胞移植后Nogo-A及NgR蛋白表达减少的可能的机制在于: ①骨髓间充质干细胞可能通过调节基质金属蛋白酶1的表达来抑制髓鞘相关抑制因子如Nogo-A的生成^[13]。②骨髓间充质干细胞还可促进突触素的表达, 突触素表达的增加亦可反馈抑制Nogo-A的生成^[7]。在脊髓损伤模型及脑梗塞模型中, 骨髓间充质干细胞移植可以保护神经功能, 同时发现其降低了Nogo-A及NgR的表达^[6-7], 这与本研究的结果是相似的。

4 参考文献

- [1] Huesa G, Baltrons MA, Gómez-Ramos P, et al. Altered distribution of RhoA in Alzheimer's disease and AβPP overexpressing mice. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(1):37-56.
- [2] Cafferty WB, Duffy P, Huebner E, et al. MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. *J Neurosci.* 2010;30(20):6825-6837.
- [3] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* 2000;403(6768):434-439.
- [4] Budel S, Padukkavidana T, Liu BP, et al. Genetic variants of Nogo-66 receptor with possible association to schizophrenia block myelin inhibition of axon growth. *J Neurosci.* 2008;28(49):13161-13172.
- [5] Wang H, Yao Y, Jiang X, et al. Expression of Nogo-A and NgR in the developing rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 2006;1114(1):212-220.
- [6] Tohda C, Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol Ther.* 2011;132(1):57-71.
- [7] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke.* 2007;38(7):2150-2156.
- [8] Kilic E, ElAli A, Kilic U, et al. Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(5):969-984.
- [9] Akbik F, Cafferty WB, Strittmatter SM. Myelin associated inhibitors: A link between injury-induced and experience-dependent plasticity. *Exp Neurol.* in press.
- [10] Wang T, Wang J, Yin C, et al. Down-regulation of Nogo receptor promotes functional recovery by enhancing axonal connectivity after experimental stroke in rats. *Brain Res.* 2010;1360:147-158.
- [11] VanGuilder HD, Farley JA, Yan H, et al. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol Dis.* 2011;43(1):201-212.
- [12] Gillani RL, Tsai SY, Wallace DG, et al. Cognitive recovery in the aged rat after stroke and anti-Nogo-A immunotherapy. *Behav Brain Res.* 2010;208(2):415-424.
- [13] Wright KT, El Masri W, Osman A, et al. Bone marrow stromal cells stimulate neurite outgrowth over neural proteoglycans (CSPG), myelin associated glycoprotein and Nogo-A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(2):559-566.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 河南省重大公益科研项目(091100910800)。

作者贡献: 王燕琳进行实验设计, 实验实施为王燕琳, 实验评估为王燕琳、闫禹、宋波张惠莉, 资料收集为王燕琳、宋波、张惠莉、龚光明、陈思、方慧, 王燕琳成文, 许予明审核, 许予明、王燕琳对文章负责。

利益冲突: 本课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验需获得郑州大学第一附属医院动物伦理委员会批准。