

经鼻腔长期输送骨髓基质细胞改善大鼠缺血再灌注性脑损伤**

王 洋¹, 沈慧娟², 朱群娥³, 王 飞³, 许卫珍⁴, 俞 千⁴, 曾宪智⁵

Long term intranasal delivery of bone marrow stromal cells improves rat brain injury caused by ischemia reperfusion

Wang Yang¹, Shen Hui-juan², Zhu Qun-e³, Wang Fei³, Xu Wei-zhen⁴, Yu Qian⁴, Zeng Xian-zhi⁵

文章亮点:

通过长期鼻腔黏膜途径输送大鼠骨髓间充质干细胞能够改善脑缺血再灌注模型大鼠 mNSS 评分及 Morris 水迷宫学习记忆能力, 而且能明显恢复其海马 CA1 区细胞数量, 这些行为学能力的改善可能与骨髓间充质干细胞治疗使得大鼠海马 CA1 区细胞数量明显恢复有关。

Abstract

BACKGROUND: Nasal delivery is a highly effective way to deliver drug into the brain, which can overcome the blockage of blood-brain barrier and peripheral side-effects.

OBJECTIVE: To explore the feasibility of long term intranasal delivery of bone marrow stromal cells for treatment of brain injury caused by ischemia reperfusion.

METHODS: Bone marrow stromal cells were sorted from rat whole bone marrow by adherent culture. Brain ischemia reperfusion rats were randomly divided into experimental group or control group. Bone marrow stromal cells or phosphate buffer saline were dropped into the nasal cavity of experimental group and control group respectively, once every 2 days for a total of 4 weeks. Rat behaviors were assessed once a week. Brain pathological examination was performed after the last behavior assessment.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the results of modified neurological severity score and Morris water maze test showed that rat behaviors of experimental group were gradually improved at 2 weeks after treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). It corresponded to behavior improvement, and ischemia reperfusion resulted in 66% cell loss in hippocampal CA1 region in the control group; however, in the experimental group, the cell loss in hippocampal CA1 region was significantly lower to 25% ($P < 0.01$). Our data indicated that long term intranasal delivery of bone marrow stromal cells can improve the brain injury caused by ischemia reperfusion.

Wang Y, Shen HJ, Zhu QE, Wang F, Xu WZ, Yu Q, Zeng XZ. Long term intranasal delivery of bone marrow stromal cells improves rat brain injury caused by ischemia reperfusion. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(27): 5072-5075. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 经鼻腔黏膜给药是一种可以克服血脑屏障、减少外周不良反应、效能高的脑内给药方式。

目的: 验证经鼻腔长期输送骨髓基质细胞治疗大鼠缺血再灌注性脑损伤的可行性。

方法: 贴壁培养法分离大鼠骨髓基质细胞。缺血再灌注脑损伤大鼠随机分成实验组和对照组。实验组经鼻腔滴入骨髓基质细胞, 对照组同法给予磷酸盐缓冲液, 隔天 1 次, 共 4 周。每周进行 1 次行为学评价, 最后 1 次行为学评价后进行脑病理学检测。

结果与结论: 与对照组比较, 从第 2 周开始神经病学严重程度评分和 Morris 水迷宫实验检测结果表明实验组行为学逐步改善($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与行为学改善相一致, 缺血再灌注导致对照组 CA1 区海马细胞数量减少了 66%, 而实验组 CA1 区细胞丢失明显要少, 只丢失了 25% ($P < 0.01$)。说明了经鼻腔长期输送骨髓基质细胞具有改善大鼠缺血再灌注脑损伤的作用。

关键词: 脑损伤; 骨髓基质细胞; 鼻腔; 血脑屏障; 缺血再灌注; 干细胞

王洋, 沈慧娟, 朱群娥, 王飞, 许卫珍, 俞千, 曾宪智. 经鼻腔长期输送骨髓基质细胞改善大鼠缺血再灌注性脑损伤[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(27):5072-5075. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

大鼠骨髓间充质细胞被证明能够通过小鼠

鼻黏膜到其大脑海马等多个脑区^[1]。另外, 直接将人源性骨髓间充质干细胞移植到脑损伤部位或注入脑室, 可以在脑卒中早期显著促进大鼠学习记忆、运动及感觉神经功能的恢复^[2]。

¹School of Medicine; ²Electrical Engineering Center, Mechanical and Electrical Engineering College; ³Medical Research Center, School of Medicine; ⁴Department of Anatomy, School of Medicine, Jiaxing College, Jiaxing 314001, Zhejiang Province, China; ⁵Department of Pathology, Zhejiang Provincial People's Armed Police Corps Hospital, Jiaxing 314000, Zhejiang Province, China

Wang Yang, School of Medicine, Jiaxing College, Jiaxing 314001, Zhejiang Province, China
wydc88@sina.com

Corresponding author: Zeng Xian-zhi, M.D., Associate professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Jiaxing College, Jiaxing 314001, Zhejiang Province, China

Supported by: Science and Technology Innovation for University Students Project in Zhejiang Province, No.2010R417021*; the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, No.Y2110158*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.27.025

Received: 2011-12-08
Accepted: 2011-12-22

课题组以前的实验表明经鼻腔移植人脐血单核细胞也能改善脑功能及缩小脑梗死体积^[3]。

本实验尝试采用经鼻腔滴入方法长期移植大鼠骨髓基质细胞来治疗大鼠缺血再灌注造成的脑损伤,并通过行为学检测和大鼠脑海马CA1区细胞丢失数量来衡量这个治疗方法的疗效。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2010-10/2011-08在嘉兴市重点实验室-嘉兴市医学分子生物学中心实验室和浙江省武警总队医院病理科进行。

材料: 3月龄SD大鼠90只,雄性,体质量(200±20) g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物许可证号SCXK(沪)2008-0016。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

主要试剂、仪器: 参见课题组前期发表的论文^[4]。

方法:

大鼠骨髓基质细胞的分离培养: 参见课题组前期发表的论文^[4]。随机取3只大鼠股骨和胫骨骨髓,通过贴壁法培养和扩增,经去除未贴壁的细胞后按1:1比例传代,收集第3代细胞用以移植治疗。

制作大脑中动脉结扎的大鼠脑梗死模型^[4]: 随机取60只大鼠6%水合氯醛按6 mL/kg对大鼠进行腹腔麻醉,分离双侧颈总动脉,用动脉夹阻断颈总动脉15 min后移去动脉夹,恢复动脉血流,组织恢复原位后,撒少许青霉素粉末,缝合皮肤,乙醇消毒,保暖至苏醒后,送回鼠笼,室温给水和食物。

动物分组及干预方式: 60只脑梗死模型大鼠以抽签法随机均分成2组:对照组和实验组。实验组大鼠鼻腔内注入大鼠第3代骨髓基质细胞,对照组给予PBS。大鼠鼻腔内给药参照Danielyan等^[5]方法和课题组前期发表的论文^[4]。用微量吸管吸取10 μL含 5×10^6 个骨髓基质细胞细胞(无菌PBS配制),用手使大鼠仰卧并固定其头部,一边鼻孔每次各注入10 μL,隔2 min,再进行第2次给药,每次给药以大鼠出现打喷嚏为有效。对照组用同样方法给无菌磷酸盐缓冲液PBS,但不含细胞。隔1 d进行1次上述给药过程,共4周。另外取10只大鼠设为正常组进行对

照观察,不进行任何干预。

改良神经病学严重程度评分: 参考文献[5]和课题组前期发表的论文^[3]。造模后第1周开始,每周进行1次以下行为学评价并记录,直到第4周。参照文献[6]进行改良神经病学严重程度评分。改良神经病学严重程度评分包括动物运动、感觉、平衡和反射检测4个项目,总分18分。得分越高表示神经损伤越严重。当大鼠不能完成某一任务或反射消失时给1分,13~18分为严重损伤;7~12分为中等损伤;1~6分为轻度损伤。以中度损伤7~12分的纳入实验。

Morris水迷宫实验: 参见课题组前期发表的论文^[3],评价学习记忆功能。直径1.5 m黑色内壁金属圆桶,置滤过之26 °C洁净水,深30 cm,墨染至非透明。桶底放直径8 cm圆柱形黑色实台,浸入水下2.5 cm,固定于第1象限,选择第4象限弧形中点为入水点并标记之。首次实验日,先将大鼠置于实台上60 s,令其自由观察,期间如果大鼠跌入或跳入水中则重新放回实台。游泳的最长时限设置为120 s。

大鼠脑病理学检测: 各组大鼠经6%水合氯醛过量麻醉后,经左心室灌注生理盐水和冰冷的(4 °C) 40 g/L多聚甲醛(0.01 mol/L PB配制),取脑,冠状切取含有海马的脑组织,在4 °C条件下,脑组织经40 g/L多聚甲醛后固定12 h,清水漂洗0.5 h,常规石蜡包埋,石蜡切片5 μm厚,所得含有海马的脑片,进行苏木精-伊红染色,在放大400倍的光镜下,每只小鼠至少选取5张含有海马结构的切片,在每张切片的海马CA1区锥体细胞层随机选取0.1 mm长度进行存活的细胞计数,计数者为有经验的病理科医生,但他不知切片来自哪一动物分组。

主要观察指标: 大鼠Morris水迷宫实验、改良神经病学严重程度评分评分及海马CA1区锥体细胞计数。

统计学分析: 由第二作者采用SPSS 10.0统计学软件进行统计学处理,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用ANOVA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 取大鼠90只备用,3

嘉兴学院,¹ 医学院,² 机电学院机电工程中心,³ 医学院医学实验中心,⁵ 医学院解剖学教研室,浙江省嘉兴市 314001;
⁴ 浙江省武警总队医院病理科,浙江省嘉兴市 314000

王洋,男,1988年生,浙江省嘉兴市人,汉族,嘉兴学院在读本科,主要从事医学方面的研究。
wydc88@sina.com

通讯作者:曾宪智,博士,副教授,嘉兴学院医学院解剖学教研室,浙江省嘉兴市 314001
frankzengxzh@yahoo.cn

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)27-05072-04

收稿日期:2011-02-08
修回日期:2011-12-22
(20110928002/D·C)

只用于骨髓基质细胞的分离培养, 70只用于实验分组观察, 其中对照组和实验组各30只, 正常组10只, 实验过程中无脱落, 均进入结果分析。

2.2 大鼠骨髓基质细胞的培养、扩增与分离 接种三四个小时后有细胞贴壁, 贴壁生长的细胞以分散、克隆集落的方式增殖, 细胞多呈梭形, 少数呈宽大扁平形和小圆形, 见图1。

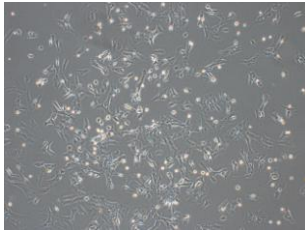


Figure 1 Morphology of primary cultured bone marrow stromal cells (×10)
图1 原代骨髓基质细胞形态(×10)

传代后的细胞贴壁很快, 细胞形态大多呈梭形, 少数呈宽大扁平形和小圆形。细胞排列逐渐规则, 呈放射状或漩涡状, 见图2。

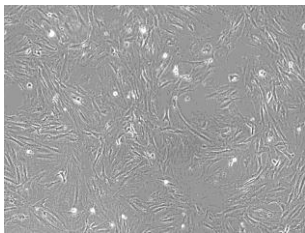


Figure 2 Morphology of the third generation of bone marrow stromal cells (×10)
图2 第3代骨髓基质细胞形态(×10)

2.3 改良神经病学严重程度评分的变化 见图3。

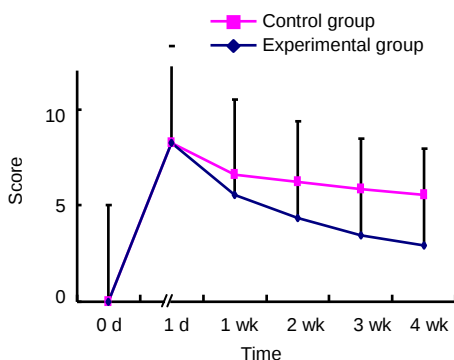


Figure 3 Modified neurological severity score
图3 改良的神经病学严重程度评分

骨髓基质细胞治疗后改良神经病学严重程度评分显示实验组大鼠神经损害明显改善。与治疗1 d比较, 大鼠治疗后1周实验组与对照组改良神经病学严

重程度评分都有一定的改善, 但之后从治疗后第2~4周, 实验组进一步改善至第4周, 而对照组未有进一步的改善。治疗后第2周单个核细胞组改良神经病学严重程度评分与对照组比较差异开始出现显著性意义($P < 0.05$), 之后差异越来越显著($P < 0.01$)。

2.4 Morris水迷宫实验结果 骨髓基质细胞治疗后Morris水迷宫实验显示实验组大鼠寻找实台的平均潜伏期缩短。治疗后1周, 实验组大鼠在Morris水迷宫实验中寻找实台的平均潜伏期较对照组缩短, 之后这种差异进一步显著。治疗后第2周相对于第1周实验组和对对照组平均潜伏期的都一定的改善, 但再往后, 实验组的寻找实台的平均潜伏期进一步缩短, 但对照组则没有继续改善, 见图4。

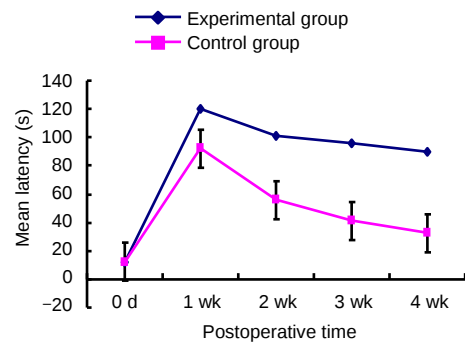


Figure 4 Mean latency to platform in Morris water maze experiment
图4 Morris水迷宫实验大鼠寻找实台的平均潜伏期

2.5 海马CA1区细胞计数 15 min双侧颈总动脉阻断形成的缺血再灌注脑损伤, 经过4周后仍然造成对照组大鼠海马CA1区66.4%细胞丢失, 从正常0.1 mm (535.6±3.5)个细胞下降到(179.9±35.3)个细胞($P < 0.001$); 而经过4周从鼻腔输送骨髓基质细胞, 实验组海马CA1区细胞数丢失明显减少, 细胞丢失只有25%, 为0.1 mm (401.7±43.5)个细胞($P < 0.01$)。实验组海马CA1区细胞数较对照组有明显恢复($P < 0.01$), 见图5, 6。

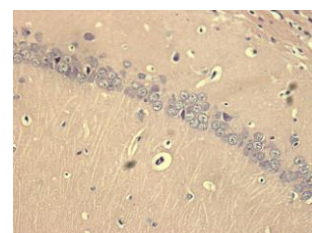


Figure 5 Less cells in the hippocampal CA1 in control group (×400)
图5 对照组海马CA1区细胞较少(×400)

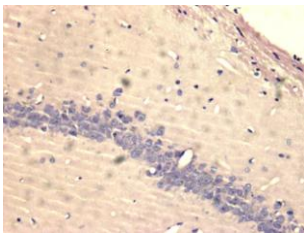


Figure 6 Significantly more cells in the hippocampal CA1 in experimental group compared with the control group ($\times 400$)

图6 实验组海马CA1区细胞数明显较多($\times 400$)

3 讨论

本实验结果表明,通过长期鼻腔黏膜途径输送大鼠骨髓基质细胞能够改善脑缺血再灌注模型大鼠改良神经病学严重程度评分及Morris水迷宫学习记忆能力,而且能明显恢复其海马CA1区细胞数量。这些行为学能力的改善可能与骨髓基质细胞治疗使得大鼠海马CA1区细胞数量明显恢复有关。骨髓基质细胞被认为可以通过免疫调节作用而在脑损伤时发挥神经保护作用,一方面通过减少病理性T细胞迁移到中枢神经系统,另一方面使细胞定居于中枢神经系统发挥保护神经元轴突和减少脱髓鞘作用,并减少因免疫介导而产生神经细胞凋亡即具有抗凋亡作用^[6]。并且骨髓基质细胞是异源性细胞群,表达各种各样调节蛋白,能够对脑损伤产生的各种不同的微环境产生相应的调节作用而发挥神经保护和治疗作用^[7]。

另外,骨髓基质细胞还能分泌或通过刺激神经胶质细胞分泌多种神经营养因子,来增强因缺血而受损的神经元的可塑性减少坏死和凋亡,以及促进内源性神经干细胞增生,以补充丢失的神经细胞,恢复神经功能^[8-9]。

大鼠间充质细胞或人类胶质细胞瘤细胞被证明能够通过小鼠鼻黏膜到达其大脑。在细胞通过筛板后,证明有2条迁移线路:①迁移到嗅球和其他脑区(如海马区)。②进入脑脊液沿着皮质表面运动进入脑实质^[1]。另外,经鼻腔也能输送人重组粒细胞集落刺激因子到脑内治疗脑梗死。这些生物活性因子是一种大分子蛋白质物质,由于肝脏的首过效应和血脑屏障的阻挡,经典的皮下或静脉给药途径未能使药物最大程度的发挥效应^[10]。

致谢:感谢嘉兴学院医学院医学实验中心张新红、陈士票、黄佳和程惠平老师提供的帮助和方便。

4 参考文献

- [1] Danielyan L, Schäfer R, von Ameln-Mayerhofer A, et al. Intranasal delivery of cells to the brain. *Eur J Cell Biol*. 2009; 88(6):315-24.
- [2] Weng JS, Liu N, Du HW, et al. Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi. 2008; 24(1):34-37.
翁金森,刘楠,杜厚伟,等.骨髓间充质干细胞移植对脑梗塞大鼠神经功能恢复及突触素表达的影响[J].细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(1):34-37.
- [3] Zeng XZ, Shen HJ, Wang Y, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(10):1794-1798.
曾宪智,沈慧娟,王洋,等.鼻腔内长期输送脐血单个核细胞对大鼠脑梗死体积及行为学的影响[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(10):1794-1798.
- [4] Wang Y, Shen HJ, Zeng XZ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(23): 4203-4206.
王洋,沈慧娟,曾宪智,等.心肌条件培养液与5-氮胞苷诱导骨髓基质干细胞向心肌样细胞的分化[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(23):4203-4206.
- [5] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*. 2001;32(11):2682-2688.
- [6] Bai L, Lennon DP, Eaton V, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009;57(11):1192-1203.
- [7] Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2011;24(1):59-64.
- [8] Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, et al. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(50):18171-18176.
- [9] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J cellular biochem* 2006;98(5):1076-1084.
- [10] He MQ, Liu XM, Sun BL. Shandong Yiyao. 2009;49(8):21-23.
何美清,刘喜梅,孙保亮.经鼻导入rhG2CSF后脑梗死大鼠内源性神经干细胞的增殖与迁移[J].山东医药, 2009,49(8):21-23.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 浙江省大学生科技创新项目(2010R417021); 浙江省自然科学基金项目(Y2110158)。

作者贡献: 第一、七作者负责实验设计、实施和论文撰写,第一、三、四、五、六、七作者进行实验,第二、五作者作为不知情者进行行为学观察及统计、图像处理。

利益冲突: 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: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。