

骨髓间充质干细胞移植联合依达拉奉抑制脑梗死后的神经元凋亡

马海燕(解放军第91中心医院药械科, 河南省焦作市 454003)

文章亮点:

1 文章以脑梗死大鼠模型为实验对象, 探讨骨髓间充质干细胞移植联合依达拉奉对水通道蛋白4、Bcl-2、脑源性神经营养因子在大鼠脑梗死区域表达的影响, 创新性地从分子生物学角度分析依达拉奉联合骨髓间充质干细胞移植治疗对脑梗死组织的保护作用。
2 结果显示, 依达拉奉可在清除自由基和抑制脂质过氧化反应后, 降低大鼠脑梗死周围组织水通道蛋白4的表达, 提高Bcl-2、脑源性神经营养因子的表达, 可明显改善大鼠的神经学功能, 减少移植细胞的凋亡。依达拉奉联合骨髓间充质干细胞移植对脑梗死大鼠的治疗效果优于单纯治疗组。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 依达拉奉; 水通道蛋白4; bcl-2 基因; 脑源性神经营养因子; 脑梗死

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 水通道蛋白4; 基因, bcl-2; 脑源性神经营养因子

摘要

背景: 国内外多项研究证实骨髓间充质干细胞移植对脑梗死组织具有一定的神经保护作用。依达拉奉是一种新型强效小分子羟自由基清除剂, 可通过清除脑梗死产生的自由基, 抑制神经细胞损伤, 从而起到脑保护作用。

目的: 观察骨髓间充质干细胞移植联合依达拉奉对大鼠脑梗死组织水通道蛋白4、Bcl-2、脑源性神经营养因子表达的影响。

方法: 选取 Wistar 大鼠 80 只, 建立右侧大脑中动脉闭塞模型, 随机分为对照组、骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组和联合治疗组。建模 6 h 后通过尾静脉分别注入移植液, 对照组注射培养液, 骨髓间充质干细胞组注射骨髓间充质干细胞, 依达拉奉组给予依达拉奉注射液, 联合组同时注入骨髓间充质干细胞和依达拉奉注射液。分别在伤后 72 h 将大鼠麻醉后断头取脑, 应用 RT-PCR、Western Blot 法检测脑组织中水通道蛋白4、Bcl-2、脑源性神经营养因子基因表达和蛋白合成变化。伤后 12, 24, 36 h 取大鼠脑组织以 TUNEL 法测定细胞凋亡情况。

结果与结论: RT-PCR、Western Blot 结果显示, 在骨髓间充质干细胞与依达拉奉联合治疗组中, Bcl-2、脑源性神经营养因子的表达明显高于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组及对照组($P < 0.05$); 而水通道蛋白4的表达低于其余各组($P < 0.05$)。TUNEL 测定结果显示, 联合治疗组中免疫组化呈棕色的凋亡细胞明显少于单独治疗组及对照组。提示骨髓间充质干细胞移植与依达拉奉联合应用治疗大鼠脑梗死, 可进一步促进损伤局部脑源性神经营养因子及 Bcl-2 的表达, 对神经细胞凋亡具有明显的抑制作用, 同时可下调水通道蛋白4水平, 减轻脑水肿程度, 二者联合运用的效果明显优于单独治疗组。

马海燕. 骨髓间充质干细胞移植联合依达拉奉抑制脑梗死后的神经元凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(10):1615-1620.

Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation combined with edaravone inhibits neuronal apoptosis after cerebral infarction

Ma Hai-yan (Department of Drugs and Medical Device, Chinese PLA 91 Central Hospital, Jiaozuo 454003, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Several studies have confirmed that bone marrow mesenchymal stem cell transplantation exerts a certain neuroprotective role in cerebral infarction. Edaravone is a novel potent small-molecule hydroxyl radical scavenger, which play a protective role in the brain by eliminating free radicals and inhibiting nerve cell damage after cerebral infarction.

OBJECTIVE: To explore the influence of bone marrow mesenchymal stem cells combined with edaravone on expressions of aquaporin-4, Bcl-2, and brain-derived neurotrophic factor after cerebral infarction in rats.

METHODS: Eighty Wistar rats were selected to establish models of cerebral infarction by right middle cerebral artery occlusion, and then randomly divided into control group, bone marrow mesenchymal stem cells group, edaravone group and edaravone+bone marrow mesenchymal stem cells group (combination group). After 6 hours of modeling, rats from these four groups were respectively injected via the tail vein with PBS, bone marrow mesenchymal stem cells, edaravone and edaravone+bone marrow mesenchymal stem cells. After 72 hours, the

马海燕, 女, 1974年生, 河南省许昌市人, 汉族, 2004年解放军第四军医大学毕业, 副主任药师, 主要从事医院药学方面的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.10.022
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)10-01615-06
稿件接受:2014-02-13

Ma Hai-yan, Associate chief pharmacist, Department of Drugs and Medical Device, Chinese PLA 91 Central Hospital, Jiaozuo 454003, Henan Province, China

Accepted: 2014-02-13

rats were decapitated to take brain tissues. Consequently, expressions of aquaporin-4, Bcl-2, and brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein were determined by RT-PCR and western blot methods. After 12, 24 and 36 hours, TUNEL method was used for the determination of cell apoptosis.

RESULTS AND CONCLUSION: The expressions of Bcl-2 and brain-derived neurotrophic factor were higher in the combination group than the other three groups ($P < 0.05$), but the expression of aquaporin-4 was lowest in the combination group ($P < 0.05$). The number of apoptotic cells in the combination group was significantly lower than that in the other three groups. These findings suggest that the combination of bone marrow mesenchymal stem cells and edaravone can improve expressions of Bcl-2 and brain-derived neurotrophic factor in the injured site, and significantly inhibit neuronal apoptosis. Meanwhile, the combination therapy can decrease expression of aquaporin-4 and mitigate cerebral edema, which is superior to bone marrow mesenchymal stem cell transplantation and edaravone alone.

Subject headings: stem cells; mesenchymal stem cells; aquaporin 4; genes, bcl-2; brain-derived neurotrophic factor

Ma HY. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation combined with edaravone inhibits neuronal apoptosis after cerebral infarction. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(10):1615-1620.

0 引言 Introduction

脑梗死是由于脑动脉粥样硬化、血管内膜损伤使脑动脉管腔狭窄、闭塞,进而导致脑组织缺血、缺氧、坏死,引起神经功能障碍的一种脑血管病,具有发病率、致残率、复发率和死亡率均高的特点,是导致人类死亡的三大常见疾病之一,给社会和家庭带来沉重的负担。因此,对脑梗死进行有效地治疗及康复一直是临床和基础研究的热点,但目前脑梗死的治疗尚缺乏理想方法。近年来,随着干细胞在生物学和医学的广泛研究,发现骨髓间充质干细胞具有取材方便、涉及伦理少、可自体移植和多向分化等优点^[1-5],骨髓间充质干细胞是骨髓中一种具有多向分化潜能的非造血干细胞,其在一定的诱导条件下具有向成骨细胞、脂肪细胞等中胚层细胞分化的能力;同时可以向外胚层的神经细胞及内胚层的肝卵圆形细胞分化。骨髓间充质干细胞来源丰富、取材方便、易纯化扩增,可自体移植,克服了伦理和免疫排斥问题,同时多项研究亦证实骨髓间充质干细胞移植可改善脑梗死模型鼠神经功能^[2-5],对脑梗死组织具有一定的神经保护作用^[6-7],国内外对此项研究均有报道^[7-9],并取得较好实验结果。依达拉奉是一种新型强效小分子羟自由基清除剂,可通过清除脑梗死产生的自由基,抑制神经细胞损伤,从而起到脑保护作用^[5-10]。

水通道蛋白家族是近些年来逐渐被发现的一类水特异性膜内在蛋白,在哺乳动物的组织中目前已发现13种水通道蛋白(水通道蛋白0-12)。迄今已在哺乳动物的脑内已发现7种水通道蛋白,分别是水通道蛋白1, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 其中水通道蛋白4为主要在脑组织中表达的水通道蛋白。水通道蛋白4参与了脑缺血、脑损伤、脑水肿等病理生理过程,调节水通道蛋白表达水平可能为脑缺血、脑水肿等的治疗提供新的途径。

Bcl-2是具有抗凋亡特性的蛋白,参与调控神经细胞凋亡发生的过程,Bcl-2表达增加可起到抑制细胞凋亡的作用。脑源性神经营养因子是1982年Barde等首先在猪脑中的一种具有神经营养作用的蛋白质。脑源性神经营养因子及其受体在神经系统广泛表达,脑源性神经营养因子能够促进神经细胞生存,增加突触可塑性及神经发生;可

抑制神经元凋亡,促进神经修复。

文章以脑梗死大鼠模型为实验对象,探讨骨髓间充质干细胞移植联合依达拉奉对水通道蛋白4、Bcl-2、脑源性神经营养因子在大鼠脑梗死区域表达的影响,从分子生物学角度分析依达拉奉联合骨髓间充质干细胞移植治疗对脑梗死组织的保护作用。

1 材料和方法 Materials and methods

设计:随机对照动物实验。

时间及地点:于2012年2月至2013年6月在解放军第91中心医院药械科完成。

材料:

骨髓间充质干细胞移植联合依达拉奉抑制脑梗死实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12、胎牛血清	Hyclone 公司
0.25%胰蛋白酶	美国 GIBCO 公司
一抗兔抗鼠水通道蛋白4、Bcl-2、脑源性神经营养因子多克隆抗体及兔抗大鼠 IgG SABC 试剂盒	SANTA 公司
依达拉奉	昆明积大制药有限公司
M-MLV 反转录酶	美国 Promega 公司
CO ₂ 培养箱	Thermo Forma 公司
超净工作台	苏州安泰空气技术公司
荧光倒置显微镜	德国 Leica 公司
TUNEL 反应液 I, II 以及结合有碱性磷酸酶的抗荧光素抗体	德国 Boehringer Mannheim 公司
显色剂坚固红(fast red)	美国 Sigma 公司
β-actin 兔抗鼠多克隆抗体和辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体	迈新公司
mRNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂盒	大连宝生生物公司
水通道蛋白4、Bcl-2、脑源性神经营养因子引物	Gene bank 基因公司合成
DNA 酶	Worthington 公司原装
Trizol	Invitrogen 公司

实验动物: 清洁级Wistar大鼠80只, 雌雄各半, 体重220–280 g, 购自华北煤炭医学院, 动物质量合格证号: SCXK20060007。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。

方法:

大鼠骨髓间充质干细胞的培养: 取1月龄雌性Wistar大鼠处死, 无菌条件下取双侧胫骨和股骨, 剪去两端骨骺, 显露骨髓腔, DMEM培养基冲洗骨髓腔, 制成单细胞悬液, 以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的浓度接种在25 mL的培养瓶中, 置于 37°C 、体积分数5% CO_2 及饱和湿度孵育箱中, 根据细胞生长情况一至两天换1次液, 去除非贴壁细胞, 并按1:2比例传代。观察细胞的生长情况, 待原代培养的细胞生长达80%–90%时, 用0.25%胰蛋白酶消化细胞使之成为单细胞悬液, 用流式细胞仪检测大鼠骨髓间充质干细胞表面抗原表达进行鉴定后, 加入含BrdU培养基进行标记。传代时细胞接种浓度 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 。

动物模型的建立: 以线栓法制作大脑中动脉栓塞模型^[4-5], 术前禁食12 h, 不禁水。大鼠用4%异氟醚吸入麻醉, 保留自主呼吸。取颈部正中切口, 逐层分离并暴露右侧颈总、颈内和颈外动脉后结扎颈总动脉和颈外动脉, 于颈总动脉近分叉处剪一“v”字形切口, 将多聚赖氨酸或明胶处理过的1.8号鱼线由切口插入右颈内动脉, 进线深度为 (18.0 ± 0.5) mm, 阻断大脑中动脉起始段及其所有血液供应。大鼠即刻出现右侧Horner征即为模型成功的标志。

模型成功的大鼠纳入实验分组: 将80只右侧大脑中动脉阻塞大鼠模型随机区组法分成4组。建模6 h后通过尾静脉分别注入移植液: 对照组注射1 mL培养液组(即脑梗死组); 骨髓间充质干细胞组注射1 mL骨髓间充质干细胞($1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$)悬液移植; 依达拉奉组注射依达拉奉注射液3 mg/(kg·d); 联合组注射1 mL骨髓间充质干细胞($1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$)+依达拉奉注射液3 mg/(kg·d)。

RT-PCR检测: 伤后72 h取每组各6只大鼠约100 mg/只脑组织制备匀浆, 用Trizol提取RNA, 紫外分光光度仪测定RNA含量, 通过MMLV试剂盒中步骤将RNA反转录成cDNA再将cDNA进行RT-PCR分析。按照Trizol试剂说明书介绍的方法提取组织总RNA, 以总RNA为模板、Oligo(dT)为引物, 通过RT-PCR两步法试剂盒将mRNA反转录成cDNA, 反应参数为: 30°C , 10 min→ 2°C , 30 min→ 99°C , 5 min→ 5°C , 5 min。将cDNA -20°C 保存。以反转录所得cDNA为模板, 相关引物序列见表1。上游引物0.5 μL 、下游引物0.5 μL , 40 μL 体系。扩增参数: 94°C , 2 min→(94°C , 30 s→ 55°C , 30 s→ 72°C , 30 s)×35循环→ 72°C , 5 min。取PCR产物通过琼脂糖电泳后采用FR200图像分析系统进行分析。

Western blot 检测: 将RT-PCR提取后剩余物以1 500 r/min离心30 min, 取上清为粗体蛋白质, Bradford

法测定蛋白浓度。5%浓缩胶40 V恒压1 h, 10%分离胶恒压60 V, 3.5 h, 湿转14 V恒压14 h, 37°C 摇床封闭2 h, 转印后加入一抗: 兔抗鼠水通道蛋白4抗体或兔抗鼠Bcl-2抗体或兔抗鼠脑源性神经营养因子(1:800) 4°C 过夜; 抗鼠 β -actin(1:5 000) 4°C 过夜。TBST洗膜5 min×4次, 山羊抗兔抗体1:700, 37°C 摇床孵育1.5 h, TBST洗膜5 min×4次。DAB显色。重复3次。Quantity one 图像分析。目的条带灰度值除以 β -actin灰度值进行结果分析。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度	温度
水通道蛋白4	上游 5'-CCA GCT GTG ATT CCA AAA CGG AC-3', 下游 5'-TCT AGT CAT ACT GAA GAC AAT ACC TC-3'	305 bp	55°C
Bcl-2	上游 5'-AGC GTC TTC AGA GAC TGC CAG-3', 下游 5'-CAC CCC TGG CAT CTT CTC CTT-3'	137 bp	55°C
脑源性神经营养因子	上游 5'-CTG GAG AAA GTC CCG GTA T-3', 下游 5'-GGT AGT TCG GCA TTG CGA GT-3'	218 bp	55°C
β -actin	上游 5'-CCA TCA TGA AGT GTG ACG TTG-3', 下游 5'-ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA -3'	175 bp	55°C

TUNEL法染色: 伤后12, 24, 36 h取每组各3只大鼠脑组织切片经石蜡包埋、脱蜡水化后, PBS漂洗5 min×3, 于 37°C 的蛋白酶K处理切片。入通透液(0.3% Triton PBS配, 含体积分数3%羊血清) 4°C 孵育20 min。将TUNEL I和II液按1:9混合滴于铺片上, 37°C 恒温箱内孵育2 h。入荧光抗体 37°C 1 h, PBS漂洗5 min×3, 滴入固红呈色液, 显微镜下监视, 约58 min停止反应。PBS漂洗5 min×3终止反应, 甘油封固剂封固, 光镜观察。

主要观察指标: ①用RT-PCR、Western Blot法检测脑组织中水通道蛋白4、Bcl-2、脑源性神经营养因子基因表达和蛋白合成的变化。②伤后12, 24, 36 h取大鼠脑组织以TUNEL法测定细胞凋亡情况。

统计学分析: 应用SPSS 11.5统计软件包进行数据分析, 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两组间比较采用S-N-K-q检验, 当 $P < 0.05$ 时为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞形态观察 接种5 d后, 首次换液可见, 细胞贴壁, 骨髓间充质干细胞散在分布于培养瓶底, 呈菱形或三角形, 胞体透亮, 折光性好, 细胞体变得细长, 并有小丛形成。5–8 d后贴壁集落数目明显增多, 随着细胞的不断扩增, 细胞形态渐趋于一致, 贴壁细胞分布均匀, 以梭形为主, 胞体饱满。第14, 15天细胞集落逐渐与邻近集落融合成片(图1)。流式细胞仪检测结果显示骨髓间充质干细胞均一性好, 纯度达97%以上。

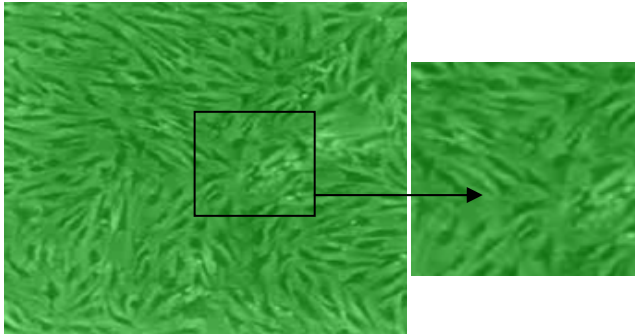


图 1 扩增纯化后的第 3 代骨髓间充质干细胞形态(光镜, ×200)

Figure 1 Morphology of third passage of bone marrow mesenchymal stem cells under a light microscope (×200)

图注: 接种 14, 15 d 细胞集落逐渐与邻近集落融合成片, 流式细胞仪检测结果显示骨髓间充质干细胞均一性好, 纯度达 97% 以上。

2.2 RT-PCR检测结果 72 h后脑梗死周围组织水通道蛋白4 mRNA的表达对照组高于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组($P < 0.05$), 差异有显著性意义; 联合治疗组中水通道蛋白4 mRNA的表达低于其余各组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

Bcl-2、脑源性神经营养因子mRNA的表达联合治疗组高于其余各组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 对照组低于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组, 差异有显著性意义($P < 0.05$, 图2A及表2)。

2.3 Western blot检测结果 72 h后脑梗死周围组织水通道蛋白4蛋白的表达对照组高于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组($P < 0.05$), 差异有显著性意义; 联合治疗组中水通道蛋白4蛋白的表达低于其余各组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。Bcl-2、脑源性神经营养因子蛋白的表达联合治疗组高于其余各组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 对照组低于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组, 差异有显著性意义($P < 0.05$, 图2B及表3)。

2.4 凋亡细胞的TUNEL标记特征 细胞核内存在棕黄色颗粒者为凋亡细胞。光镜下(×400)细胞散布于整个缺血区内, 病灶边缘可见成堆的阳性细胞, 有染色质边集及核固缩现象, 个别区域可见凋亡小体。TUNEL法测定, 联合治疗组中免疫组化呈棕黄色颗粒的凋亡细胞明显少于单独治疗组及对照组(表4及图3)。

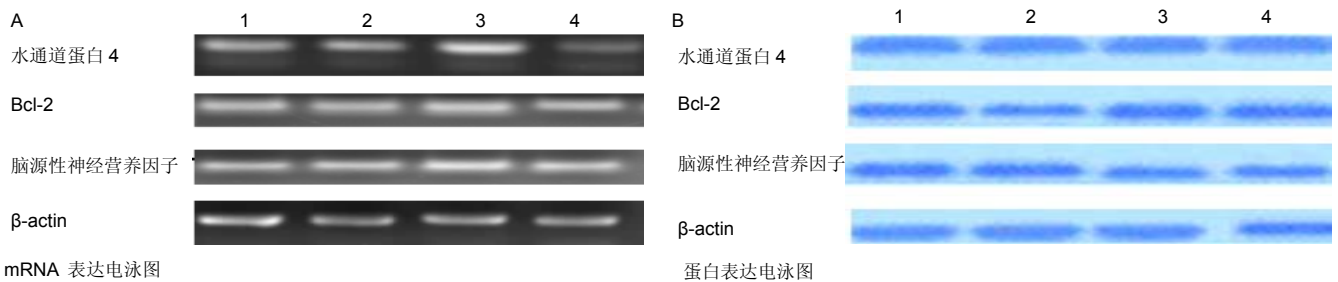


图 2 不同方法治疗后各组大鼠水通道蛋白 4、Bcl-2、脑源性神经营养因子 mRNA 及蛋白表达电泳图

Figure 2 Electrophoresis of aquaporin-4, Bcl-2, and brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein after different treatments

图注: 图中 1, 2, 3, 4 分别为对照组、骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组及联合治疗组。

骨髓间充质干细胞与依达拉奉联合治疗组 Bcl-2、脑源性神经营养因子的 mRNA 及蛋白表达明显高于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组及对照组($P < 0.05$); 而水通道蛋白 4 的 mRNA 及蛋白表达低于其余各组($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠脑梗死周围组织水通道蛋白 4、Bcl-2、脑源性神经营养因子 mRNA 表达的比较

Table 2 Expression of aquaporin-4, Bcl-2, and brain-derived neurotrophic factor mRNA around the infarcted tissues ($\bar{x} \pm s, n=6$)

检测指标	对照组	骨髓间充质干细胞组	依达拉奉组	联合治疗组
水通道蛋白4 mRNA (水通道蛋白4/ β -actin)	1.17±0.20 ^a	0.82±0.12 ^a	0.69±0.08 ^a	0.43±0.05
Bcl-2 mRNA(Bcl-2/ β -actin)	0.56±0.08 ^a	0.98±0.20 ^a	0.74±0.11 ^a	1.34±0.22
脑源性神经营养因子mRNA(脑源性神经营养因子/ β -actin)	0.61±0.08 ^a	0.93±0.16 ^a	1.27±0.14 ^a	1.54±0.20

表注: 骨髓间充质干细胞与依达拉奉联合治疗组 Bcl-2、脑源性神经营养因子的 mRNA 表达明显高于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组及对照组($P < 0.05$); 而水通道蛋白 4 的 mRNA 表达低于其余各组($P < 0.05$)。与联合治疗组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠脑梗死周围组织水通道蛋白 4、Bcl-2、脑源性神经营养因子蛋白表达的比较

Table 3 Expression of aquaporin-4, Bcl-2, and brain-derived neurotrophic factor protein around the infarcted tissues ($\bar{x} \pm s, n=6$)

检测指标	对照组	骨髓间充质干细胞组	依达拉奉组	联合治疗组
水通道蛋白4蛋白(水通道蛋白4/ β -actin)	1.43±0.24 ^a	0.96±0.18 ^a	0.75±0.09 ^a	0.52±0.04
Bcl-2蛋白(Bcl-2/ β -actin)	0.75±0.08 ^a	1.32±0.24 ^a	0.96±0.17 ^a	1.69±0.25
脑源性神经营养因子蛋白(脑源性神经营养因子/ β -actin)	0.82±0.07 ^a	1.20±0.17 ^a	1.38±0.15 ^a	1.69±0.19

表注: 骨髓间充质干细胞与依达拉奉联合治疗组 Bcl-2、脑源性神经营养因子的蛋白表达明显高于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组及对照组($P < 0.05$); 而水通道蛋白 4 的蛋白表达低于其余各组($P < 0.05$)。与联合治疗组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表4 各组大鼠不同时间点脑组织凋亡细胞数比较

Table 4 Comparison of number of apoptotic cells in brain tissues at different time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

伤后时间	对照组	骨髓间充质干细胞组	依达拉奉组	联合治疗组
12 h	43.12±0.03 ^a	29.07±0.26 ^a	30.35±0.50 ^a	16.51±0.48
24 h	34.30±0.12 ^a	18.61±0.38 ^a	18.71±0.29 ^a	12.30±0.13
36 h	31.02±0.13 ^a	15.34±0.27 ^a	16.35±0.30 ^a	10.08±0.15

表注：联合治疗组中凋亡细胞数明显少于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组及对照组($P < 0.05$)。与联合治疗组比较，^a $P < 0.05$ 。

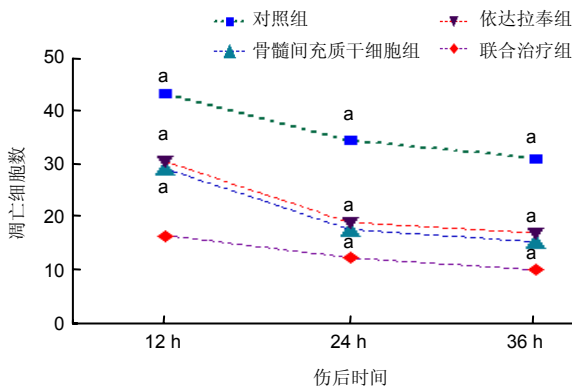


图3 各组大鼠不同时间点脑组织凋亡细胞数

Figure 3 Number of apoptotic cells in brain tissues at different time

图注：联合治疗组中免疫组化呈棕黄色颗粒的凋亡细胞数明显少于骨髓间充质干细胞、依达拉奉单独治疗组及对照组($P < 0.05$)。与联合治疗组比较，^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

急性脑梗死好发中老年人，有很高的发病、致残和病死率。脑梗死发生后脑组织因缺血、缺氧而致神经功能损害，长期的神经功能损伤则可能导致脑神经功能的永久性缺陷^[11-12]。目前对脑梗所致缺血缺氧性脑损伤的研究有了新进展，干细胞移植是其研究热点之一^[13-14]。骨髓间充质干细胞是一种多潜能成体干细胞，具有多向分化潜能和自我更新的特点。研究表明骨髓间充质干细胞可分泌多种细胞因子，发挥抗凋亡、抗炎，促进脑损伤组织内源性修复等作用^[14-15]。多项研究表骨髓间充质干细胞可能通过以下途径作用于神经系统^[14-17]：①骨髓间充质干细胞移植后能够向病变部位的组织渗透融合、进而替代或补充损伤神经原细胞，起到恢复中枢神经系统功能的作用。②移植的骨髓间充质干细胞能够减少脑缺血区神经细胞凋亡^[16-20]。③移植的骨髓间充质干细胞可以通过旁分泌或自分泌的方式分泌营养因子和细胞因子，进而使周围的一些神经干细胞分化为新的神经元而进行自我修复^[19-21]。④移植的骨髓间充质干细胞可以减轻脑梗死局部的炎症反应。有研究表明，骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脑梗死可抑制局部炎症反应和异凝集素结合细胞的聚集^[22]。也有研究证明，静脉移植骨髓间充质干细胞治疗大鼠脑缺血能够缩小梗死体积、抑制Caspase-3依赖性细胞的凋亡^[23]。本实验结果亦表明，移植组大鼠神经细胞凋亡显著少于对照组，表明移植的骨髓间充质干细胞抑制了神经细胞的凋亡。但单纯骨髓间充

质干细胞移植的修复作用欠理想，还需与药物及生物材料等手段结合进行综合治疗^[23]。

脑梗死形成后，会出现局灶性脑缺血、脑水肿、脑细胞凋亡等，而氧自由基是其发生的主要因素。通常脑水肿是指脑组织含水量增加所引起的脑体积增大，它包括3种类型：细胞毒性脑水肿、血管源性脑水肿和混和性脑水肿。脑缺血再灌注后的脑水肿是一种细胞毒性和血管源性脑水肿的混和型。细胞毒性脑水肿在缺血性卒中时即刻发生，是由于急性脑缺血死亡细胞释放的细胞毒性物质引起，继发于神经元和胶质细胞肿胀，其中自由基发挥着重要作用。依达拉奉是一种强效自由基清除剂和抗氧化剂，能有效地清除体内的活性氧分子，抑制梗死区迟发性神经元死亡^[24-26]。本实验结果表明将骨髓间充质干细胞移植应用于修复大鼠脑梗死的过程中，能够进一步的使水通道蛋白4表达下降、脑水肿程度减轻，使Bcl-2表达增强，从而抑制神经细胞的凋亡，其具体作用是通过清除大鼠脑梗死区脑组织中的活性氧分子达到的。大鼠脑梗死后，梗死区产生大量活性氧分子，导致继发脑水肿的发生，水通道蛋白4在脑水肿发生过程中起着不可忽略的作用。有研究结果显示，脑梗死后脑组织梗死区水通道蛋白4表达明显上调，而远离梗死区正常脑组织水通道蛋白4表达较低^[27-29]，本实验结果与其亦相符。

Bcl-2是具有抗凋亡特性的蛋白，参与调控神经细胞凋亡发生的过程，Bcl-2表达增加可起到抑制细胞凋亡的作用^[30-35]。脑源性神经营养因子分布在中枢神经系统、周围神经系统、其能够促进神经细胞生存，增加突触可塑性及神经发生。脑源性神经营养因子能抑制神经元凋亡，促进神经修复，脑源性神经营养因子表达增高，可以维持神经元的存活和再生^[36-39]。本实验结果显示在骨髓间充质干细胞与依达拉奉联合治疗组中，Bcl-2、脑源性神经营养因子的表达明显高于骨髓间充质干细胞组、依达拉奉组及对照组；而水通道蛋白4的表达低于其余各组。说明二者联合可以对大鼠脑梗死起到较好治疗效果。

总之，用骨髓间充质干细胞联合依达拉奉治疗大鼠脑梗死，能使移植的骨髓间充质干细胞在损伤部位更好的存活。可进一步促进损伤局部脑源性神经营养因子的高表达，促进脑梗死后大鼠神经功能的恢复。二者联合应用后使水通道蛋白4表达下降、脑水肿程度减轻，使Bcl-2表达增强，从而抑制神经细胞的凋亡，这可以为临床治疗脑梗死提供新的理论依据。

作者贡献：实验设计及评估由第一作者完成，干预实施由实验员完成，均经过正规培训。

利益冲突：文章及内容不涉及相关利益冲突。

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。

学术术语：水通道蛋白4-水通道蛋白家族是近些年来逐渐被发现的一类水特异性膜内在蛋白，迄今已在哺乳动物的脑内已发

现7种水通道蛋白,其中水通道蛋白4为主要在脑组织中表达的水通道蛋白,参与了脑缺血、脑损伤、脑水肿等病理生理过程。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Liu J, Zhu H, Liu Y, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin10 expression in Macaca fascicularis. *Brain Res.* 2010;1334:65-72.
- [2] Shichinohe H, Kuroda S, Yano S, et al. Improved expression of gamma-aminobutyric acid receptor in mice with cerebral infarct and transplanted bone marrow stromal cells: an autoradiographic and histologic analysis. *J Nucl Med.* 2006; 47(3):486-491.
- [3] Egilts MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(8): 4080-4085.
- [4] 张婷勇.骨髓间充质干细胞移植并用单唾液酸神经节苷脂治疗大鼠脑梗死[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(14): 2557-2561.
- [5] 张洪连,吴晓牧. 骨髓间充质干细胞移植治疗脑梗死及存在问题[J].中华脑血管病杂志,2010,4(4):300-307.
- [6] Wen J, Feng X. Patterns of Nogo-A, NgR, and RhoA expression in the brain tissues of rats with focal cerebral infarction. *Transl Res.* 2009;154(1):40-48.
- [7] 周国庆,金怡,张鹏.沉默RhoA基因对骨髓间充质干细胞静脉移植治疗脑梗死大鼠的作用[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,14(45):8416-8420.
- [8] 郑彤,孟繁凯,李光民,等.大鼠骨髓间充质干细胞分离培养及向神经元样细胞诱导分化的实验研究[J].中国煤炭工业医学杂志, 2007,10(12):1404-1405.
- [9] Peng Y, Zhang QM, You H, et al. Growth-associated protein 43 and neural cell adhesion molecule expression following bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of ischemic brain injury. *Neural Regen Res.* 2010; 5(13):975-980.
- [10] Chu K, Kim M, Park KI, et al. Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res.* 2004;1016(2):145-153.
- [11] 李传玲,李晓宾,董瑞国,等.亚低温联合 β -七叶皂甙钠对实验性脑出血后AQP4表达及脑水肿的影响[J].神经疾病与精神卫生, 2011,11(5):478-481.
- [12] 纪风涛,曹铭辉,梁建军,等.姜黄素预处理对大鼠脑缺血/再灌注损伤后AQP-4及脑水肿的影响[J].中国药理学通报,2011, 27(4): 524-527.
- [13] 张志英,任丛莉,李亮,等.骨髓源神经干细胞的分离、培养及鉴定[J].解剖学杂志,2006,29(Suppl):90.
- [14] 庄淑波,刘毅,陈克明,等.大鼠骨髓间充质干细胞体外分离、纯化与培养适宜条件的筛选[J].中国组织工程研究与临床康复,2007, 11(20):3886-3891.
- [15] 鹿寒冰,董瑞国,李晓宾,等.大鼠实验性脑梗死后AQP4表达与MRI变化的相关性研究[J].卒中与神经疾病,2011,18(6): 348-352.
- [16] 王士雷,王艳婷,江岩,等.4000/预防性应用克罗卡林对大鼠脑缺血后AQP-4和血脑屏障通透性的影响[J].中国神经再生研究, 2011,6(13):1005-1009.
- [17] Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, et al. Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 2005;29(7):1417.
- [18] 李妍,崔向宁,陈泽涛,等.活血化瘀中药对脑出血大鼠脑组织含水量及AQP4表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19): 153-156.
- [19] 欧阳锡华,贾军,刘政委.脑外伤患者AQP4的表达及其与临床预后的关系[J].四川医学,2012,33(4):676-678.
- [20] Wen JM, Ma XL, Liu KD. Advance of mesenchymal stem cells in the therapy of cerebral infarction. *Wujing Yixue.* 2006; 17(11): 845-846.
- [21] 杨振兴,李宗正.小剂量地塞米松对创伤性脑水肿AQP4的影响[J].宁夏医科大学学报,2012,34(6):600-603,540.
- [22] 邵宝平,余华晟,王建林.AQP9在脑疾病中的研究进展[J].动物医学进展,2012,33(1):87-91.
- [23] 王复新,张洁,王辰,等.尼莫地平对早期脑出血大鼠AQP4mRNA、MMP-9mRNA表达的影响[J].黑龙江医药科学,2012,35(4):1-2.
- [24] Veizovic T, Beech JS, Stroemer R, et al. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke.* 2001;32(4):1012-1019.
- [25] 张波,孙善全,甘胜伟,等.两种脑出血动物模型的AQP4表达与磁共振成像的比较研究[J].中国临床解剖学杂志,2012,30(3): 329-332.
- [26] 王海合,卢红,丁继岩,等. β -7叶皂甙钠对大鼠局灶性脑缺血再灌注后AQP4蛋白表达的影响[J].中风与神经疾病杂志,2012, 29(6):534-537.
- [27] 林重辉,郑文玲,杨军,等.乌司他丁对大鼠缺血性脑水肿组织AQP4表达的影响[J].中国医药指南,2012,10(15):441-442.
- [28] 崔向宁,尹岭,王玉来.水通道蛋白4在大鼠创伤性脑水肿中的作用机制[J].中国康复理论与实践,2005,11(9):719-721.
- [29] Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? *Stroke.* 1993;24(2):294-297.
- [30] 赵小妹,刘永刚.骨髓间充质干细胞与上清液治疗大鼠脑梗死的疗效[J].新乡医学院学报,2012,29(8):571-574.
- [31] Li Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. *Neurology.* 2002;59(4):514-523.
- [32] Peng Y, Zhang QM, You H, et al. Growth-associated protein 43 and neural cell adhesion molecule expression following bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of ischemic brain injury. *Neural Regen Res.* 2010;5(13):975-980.
- [33] 谭华,何晓英,李小刚.依达拉奉治疗急性脑出血的临床疗效及对自由基含量的影响[J].中国药房,2007,18(29):2296-2297.
- [34] 刘信东,张利娟,赵丽君.依达拉奉治疗大面积脑梗死的临床疗效观察[J].四川医学,2012,33(3):431-433.
- [35] 张敏,张月,吕辉,等.依达拉奉注射液联合苦碟子注射液治疗急性脑梗死的疗效观察[J].中国医院用药评价与分析,2012,12(3): 249-251.
- [36] 叶冠龙.低分子肝素钙与依达拉奉联合治疗对进展性脑梗死的疗效及血清一氧化氮的影响[J].中国医院用药评价与分析,2010, 10(4):335-336.
- [37] 赵彬,刘斌,张玉芹.依达拉奉对脑出血大鼠血肿周围组织Caspase-3和Pdcd-5蛋白表达的影响[J].天津医药,2012, 40(5): 483-485.
- [38] 吴秋义,徐庶,丁新生.依达拉奉联合奥扎格雷钠对大鼠缺血再灌注损伤后的脑保护作用[J].现代中西医结合杂志,2011,20(10): 1185-1188.
- [39] Kim SS, Yoo SW, Park TS, et al. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. *Stem Cells.* 2008;26(9): 2217-2228.