骨髓间充质干细胞可减轻脑卒中缺血周围皮质小胶质细胞过度激活引起的脑损伤

https://doi.org/10.12307/2022.555
投稿日期：2021-02-25
采用日期：2021-04-10
修回日期：2021-09-07
在线日期：2021-10-13
中图分类号：
R459.9；R318；R743.3
文章编号：
2095-4344(2022)24-03790-06
文献标识码：A

颜 南[1]，伍彦龙[2]，唐晓慧[2]，张笑妍[2]，王 慧[2]，杨天泽[2]，周懋淳[2]，王正东[3]，杨晓霞[1]

文章快速阅读：

文章特点—
△通过腹腔注射移植骨髓间充质干细胞可抑制脑卒中梗死灶周围小胶质细胞的过度活化，降低炎性细胞因子的表达，从而在一定程度上保护大脑皮质免受伤害，促进运动功能的恢复。

30 只 8 周龄的 SD 大鼠

假手术组 → DMEM
模型组 → DMEM
移植组 → 骨髓间充质干细胞

→ BBB 评分
→ 脑缺血周围皮质

检测指标：
(1) 苏木精–伊红染色观察脑缺血周围皮质结构；
(2) 免疫组化染色和 Western blot 检测 Ox-42 以及肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6、白细胞介素 1β 的蛋白表达。

文题释义：
缺血性脑卒中：是由于心脑血管系统发生病变或损伤，产生的斑块或栓子进入血液，导致脑部血流中断，大脑无法获取营养和氧气而引发的脑组织结构和功能严重损伤的一种急性脑血管疾病，具有高死亡率、高致残率的特点。
小胶质细胞：是神经胶质细胞的一种，参与中枢神经系统的稳态保护和宿主对病原体的防御。近年来，人们认识到小胶质细胞在脑损伤后具有双重作用，一方面在脑损伤周围皮质小胶质细胞会迅速激活，通过吞噬作用清除细胞碎片，并释放神经生长及抗炎因子而减轻神经损伤，促进组织修复；另一方面，小胶质细胞过度活化后可释放高水平的促炎因子及细胞毒性物质，诱发神经炎症，加重对大脑周围皮质的损伤作用。

摘要
背景：骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑卒中取得了较好效果，但其作用机制仍需进行深入研究。
目的：探讨骨髓间充质干细胞对缺血周围皮质过度活化的小胶质细胞损伤的影响。
方法：将30只8周龄的SD大鼠分为假手术组、模型组、移植组。模型组和移植组采用栓线法阻断大脑中动脉，建立大鼠缺血性脑卒中模型，术后将第3代骨髓间充质干细胞注入到移植组大鼠腹腔内，模型组和假手术组大鼠腹腔内注射相同量的DMEM培养液，各组均隔天注射1次，共持续14 d。术后第7，14天，通过BBB法来评估各组大鼠的运动功能，术后15 d取大鼠脑梗死灶周围皮质并应用免疫组织化学染色法、蛋白印迹法检测活性小胶质细胞标志物Ox-42以及促炎因子肿瘤坏死因子α、白细胞介素6、白细胞介素1β的表达。
结果与结论：与假手术组相比，模型组小胶质细胞激活的Ox-42和肿瘤坏死因子α、白细胞介素6、白细胞介素1β表达水平较高，移植组上述指标表达水平较低。与模型组相比，移植组BBB评分明显提高，肢体运动功能有所改善。结果表明，骨髓间充质干细胞抑制梗死灶周围小胶质细胞的过度活化，降低了炎性细胞因子的表达，从而在一定程度上保护了大脑皮质免受伤害，促进了运动功能的恢复。
关键词：干细胞；骨髓间充质干细胞；缺血性脑卒中；肿瘤坏死因子α；白细胞介素6；白细胞介素1β；Ox-42

Bone marrow mesenchymal stem cells may alleviate brain damage caused by the microglial overactivation in the cortex around ischemic site of stroke

Yan Nan[1], Wu Yanlong[2], Tang Xiaohui[2], Zhang Xiaoyan[2], Wang Hui[2], Yang Tianze[2], Zhou Maochun[2], Wang Zhengdong[3], Yang Xiaoxia[1]
[1]School of Medical Applied Technology, [2]Basic Medical College, [3]Department of Anatomy, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China
Yan Nan, MD, Associate professor, School of Medical Applied Technology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China
Corresponding author: Yang Xiaoxia, Master, Professor, School of Medical Applied Technology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

Abstract
BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation has achieved good results in the treatment of ischemic stroke, but its mechanism of action still needs to be studied in depth.
OBJECTIVE: To study the effects of bone marrow mesenchymal stem cells on further damage of overactivated microglia in the cortex around ischemic site.
METHODS: Thirty 8-week-old Sprague-Dawley rats were divided into sham operation, model, and transplantation groups. The ischemic stroke models of rats were established with blocking the middle cerebral artery with an embolic thread method for the model group and transplantation group. The third generation of bone marrow mesenchymal stem cells was injected into the abdominal cavity of the transplantation. Rabbits of the model group and the sham operation group were injected with the same amount of DMEM. The injection was taken on every other day after surgery for 14 consecutive days. The motor function

沈阳医学院，[1]医学应用技术学院，[2]基础医学院，[3]解剖学教研室，辽宁省沈阳市 110034
第一作者：颜南，女，1978 年生，辽宁省营口市人，汉族，2018 年中国医科大学毕业，博士，副教授，主要从事神经损伤与修复研究。
通讯作者：杨晓霞，硕士，教授，沈阳医学院医学应用技术学院，辽宁省沈阳市 110034
https://orcid.org/0000-0002-8250-8080 (杨晓霞)
基金资助：国家自然科学基金青年科学基金项目 (81803200)，项目负责人：颜南；辽宁省科学技术计划项目 (2017225059)，项目负责人：杨晓霞；2020 年度沈阳市中青年科技创新人才支持计划 (RC200238)，项目负责人：颜南；沈阳医学院科学研究基金 (20161009)，项目参与人：王正东
引用本文：颜南，伍彦龙，唐晓慧，张笑妍，王慧，杨天泽，周懋淳，王正东，杨晓霞 . 骨髓间充质干细胞可减轻脑卒中缺血周围皮质小胶质细胞过度激活引起的脑损伤 [J]. 中国组织工程研究，2022，26(24):3790-3795.

of paralyzed rats in different groups was evaluated by BBB scores at 7 and 14 days after surgery. At 15 days after operation, the cortex around the cerebral infarction was taken from the rats. Immunohistochemical staining and western blot assay were applied to study the expression of Ox-42, a marker of activated microglia, and tumor necrosis factor-α, interleukin-6, and interleukin-1β in the cortex near the ischemia cortex.
RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the sham operation group, expression levels of Ox-42 activated by microglia and tumor necrosis factor-α, interleukin-6, and interleukin-1β were higher in the model group, and decreased in the transplantation group. Compared with the model group, BBB scores showed an improved motor function of paralysis limbs in the transplantation group. It is concluded that the over-activation of microglia is inhibited, and the expression of inflammatory cytokines is decreased with bone marrow mesenchymal stem cells, thus to protect the cerebral cortex from damaging and promote motor function recovery to a certain extent.
Key words: stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; ischemic stroke; tumor necrosis factor-α, interleukin-6, and interleukin-1β; Ox-42

Funding: *the Youth Science Fund Project of National Natural Science Foundation of China, No. 81803200 (to YN); Science and Technology Program Project of Liaoning Province, No. 2017225059 (to YXX); Youth Science and Technology Innovation Talent Support Program of Shenyang in 2020, No. RC200238 (to YN); Scientific Research Fund of Shenyang Medical College, No. 20161009 (to WZD)*
How to cite this article: *YAN N, WU YL, TANG XH, ZHANG XY, WANG H, YANG TZ, ZHOU MC, WANG ZD, YANG XX. Bone marrow mesenchymal stem cells may alleviate brain damage caused by the microglial overactivation in the cortex around ischemic site of stroke. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(24):3790-3795.*

0 引言 Introduction

缺血性脑卒中是由于急性脑血管阻塞,导致脑组织缺血，从而使脑组织结构和功能严重受损，具有高死亡率、高致残率的特点，是脑卒中最常见的一类。随着生活水平的提高，并伴随生活压力的增大，脑卒中发病越来越有年轻化的趋势。因此，探讨缺血性脑卒中的病因和机制并研究出良好的治疗方法很有必要。缺血性脑卒中的病理生理学机制涉及能量代谢紊乱、免疫和炎症反应 [1]、细胞凋亡 [2]、离子失衡和血脑屏障破坏 [3]。在中枢神经系统疾病中，小胶质细胞是产生炎症的关键细胞，参与中枢神经系统的稳态保护和宿主对病原体的防御。近年来，人们认识到小胶质细胞在脑损伤后具有双重作用，一方面在脑损伤周围皮质小胶质细胞会迅速激活，通过吞噬作用清除细胞碎片，并释放神经生长及抗炎因子而减轻神经损伤，促进组织修复 [4-5]；另一方面，小胶质细胞过度活化后可释放高水平的促炎因子及细胞毒性物质，诱发神经炎症，加重对大脑周围皮质的损伤作用 [6]。

骨髓间充质干细胞具有无免疫应答、体外培养增殖快、多能分化等优点 [7-9]，治疗多种疾病均有良好的疗效 [10-14]。许多研究发现骨髓间充质干细胞直接移植入脑内治疗脑缺血，可有效减少缺血半暗带的细胞凋亡，促使脑部周围干细胞、祖细胞的增殖与分化，改善脑缺血动物的神经功能缺失症状。该研究拟建立大脑中动脉梗死模型，通过腹腔注射移植骨髓间充质干细胞后进行动物模型的行为学和生物分子分析，旨在探讨腹腔内移植骨髓间充质干细胞对脑卒中缺血周围皮质小胶质细胞过度激活引起的脑皮质损伤的保护作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计　随机对照动物实验，多组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点　实验于 2019 年 3-7 月在沈阳医学院实验动物中心、中心实验室和公共卫生实验中心完成。

1.3 材料　2 只健康 SD 大鼠 (1 周龄，体质量 15-25 g，雄性) 分离培养骨髓间充质干细胞和 30 只 SD 大鼠 (8 周龄，体质量 210-310 g，雄性) 制作缺血性脑卒中模型，由辽宁长生生物技术有限公司提供，动物生产许可证号：SCXK (辽)2015-0001。该研究获得沈阳医学院实验动物福利伦理委员会的批准 (许可证号：SYYXY2019030601)。大鼠自由进食和饮水，饲养温度 26-28 ℃，相对湿度为 40%-60%。常规饮食适应性喂养 1 周后，将 30 只 SD 大鼠随机分为 3 组：假手术组、模型组和移植组，每组 10 只。

1.4 实验方法

1.4.1 分离和培养骨髓间充质干细胞　通过全骨髓贴壁方法分离并培养骨髓间充质干细胞。颈椎脱位处死 2 只 SD 大鼠，浸入体积分数 75% 乙醇中 3 min，在无菌条件下分离大鼠双侧股骨和胫骨，去除附着于骨表面的软组织，切除骨骺端，用 DMEM 培养液 (Hyclone) 冲洗骨髓腔，直至骨髓腔变白。收集细胞冲洗液，过 200 目筛网制成单细胞悬液，移入 15 mL 离心管，1 000 r/min 离心 5 min，将细胞沉淀重悬于　5 mL 含体积分数 10% 胎牛血清的新鲜 DMEM 完全培养基，然后轻轻吹打制成单细胞悬液，接种到 25 cm^2 培养瓶，置于 37 ℃、体积分数为 5%CO_2 培养箱，每隔 24 h 用相差显微镜观察 1 次，当细胞融合至 85% 左右时，用 2.5 g/L 胰蛋白酶 / 0.02%EDTA (Genview) 消化传代，在显微镜下观察大多数细胞收缩变圆时用 DMEM 完全培养基终止消化，用第 3 代细胞进行以下实验。

1.4.2 骨髓间充质干细胞的鉴定　将生长至 80% 的第 3 代骨髓间充质干细胞用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min，在室温下用 1%TritonX-100 处理 10 min，PBS 清洗 3 遍，用蜡笔描绘细胞，加入 1 滴内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min，加入 1 滴非特异性阻断剂室温孵育 10 min，加入兔抗小鼠 CD29 抗体 (ABclonal)，4 ℃湿盒中孵育过夜，加入生物素标记的羊抗兔 IgG 二抗，室温孵育 1 h，PBS 冲洗 3 次，加入链霉素抗生物素蛋白过氧化物酶室温孵育 10 min，PBS 冲洗 3 次，DAB 显色，苏木精对细胞核进行染色，1% 盐酸乙醇分化几秒钟，用流水冲洗至蓝色，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封固，显微镜下观察。

1.4.3 大脑中动脉梗死模型制备及骨髓间充质干细胞移植　腹腔注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉 SD 大鼠，大鼠颈前部剃毛，皮肤消毒，沿着颈部正中线切开浅筋膜和气管前肌，然后将肌肉和筋膜与右胸锁乳突肌一起钝性分离，使其暴露出右颈总动脉，操作过程中小心分离伴随的迷走神经，分离到右颈总动脉分叉时，结扎右颈总动脉的近心端和颈外动脉的起始处，并夹闭颈内动脉阻断血流以控制剪开右颈总动脉后血液反流，并在靠近右颈总动脉分叉处，距离分叉点约为 4 mm 用眼科剪将右颈总动脉的近端剪成 45° 倾斜的开口，从开口处将线栓插入右颈总动脉，当线栓顶点接近颈内动脉

时，松开颈内动脉血管夹，然后将线栓慢慢插入距右颈总动脉分叉约 18 mm 的大脑中动脉并结扎，逐层缝合伤口。术后将大鼠放在干燥的笼子里，注意呼吸道通畅，防止窒息。术后约 1 h，移植组腹腔内注射细胞浓度为 1×10^{10} L^{-1} 的第 3 代骨髓间充质干细胞 3 mL，模型组和假手术组术后约 1 h 注射等体积的 DMEM，各组均隔天注射，共持续 14 d。

采用 Zea Longa 的 6 级评分方法筛选出正常可参与实验的大鼠，剔除不合格大鼠[15]。Zea Longa 的 6 级评分方法分级标准为：0 级，无神经缺陷症状；1 级，不能完全伸展到对侧前肢；2 级，行走时向偏瘫侧转圈；3 级，行走时向偏瘫侧倾倒；4 级，不能自发行走，伴随意识障碍；5 级，死亡，其中 1–3 级大鼠可纳入实验。造模成功率约为 77% (23/30)，死亡率为 23% (7/30)，死亡大鼠以新鼠补充，确保每组实验动物总数相等。

1.4.4 运动功能评估 术后 7 d 根据 BBB 功能评定量表评估 3 组大鼠四肢运动功能[16]，根据关节运动的频率、范围和运动负荷对大鼠四肢运动功能进行评分。0 分为完全瘫痪，21 分为运动功能正常，并由 2 名独立的技术人员根据 BBB 评定量表观察肢体的协调性，使用双盲法评估。

1.4.5 样本采集 术后 15 d SD 大鼠腹膜内注射戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 麻醉处死，一部分脑组织转移至 −80 ℃冰箱保存备用；另一部分脑组织浸泡在 40 g/L 多聚甲醛中固定，置于 4 ℃冰箱中保存固定 2 d 备用。

1.4.6 苏木精 – 伊红染色 取出 40 g/L 多聚甲醛固定好的脑组织，切取梗死灶旁 0.5 cm 的大脑皮质，浸入 30% 蔗糖溶液中浸泡 48 h，直至组织沉底，然后用 OCT 包埋剂包埋，将其放在冷冻切片机 (Leica) 的样品架上，快速冷冻至 −20 ℃，切成厚度为 8–15 μm 的切片，在 37 ℃烘箱中干燥，苏木精染色 5 min，流水洗涤，1% 盐酸乙醇分化 30 s，流水冲洗 10 min，伊红染色 1 min，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封固，显微镜下观察。

1.4.7 免疫组化实验 取出 40 g/L 多聚甲醛固定好的脑组织，切取梗死灶旁 0.5 cm 的大脑皮质，大脑皮质切片的处理步骤与苏木精 – 伊红染色相同，PBS 冲洗切片 3 次，加入内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min，PBS 冲洗 3 次，加入非特异性染色阻断剂室温孵育 10 min，去除阻断剂，加入肿瘤坏死因子 α(1 ∶ 1 000，ABclonal)、白细胞介素 6(1 ∶ 1 000，ABclonal)、白细胞介素 1β(1 ∶ 1 000，ABclonal)、Ox-42(1 ∶ 1 000，Abcam) 一抗，4 ℃孵育过夜，阴性对照不加抗体，PBS 漂洗 3 次，加入生物素标记的羊抗兔 IgG，室温孵育 40 min，加入链霉素抗生物素蛋白过氧化物酶室温孵育 1 h，PBS 漂洗 5 次，DAB 染色 10 min，切片浸泡于蒸馏水中洗涤后苏木精染色，1% 盐酸乙醇分化数秒钟，用流水冲洗至蓝色，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封固，显微镜下观察阳性细胞，在 100× 镜下随机选取 5 个视野，Image J 图像分析软件定量测定每个视野区域内阳性表达的平均吸光度值。

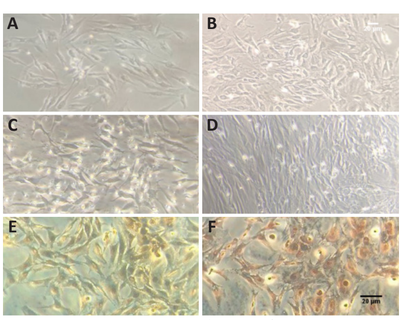
1.4.8 免疫印迹实验 取出 −80 ℃冰箱保存的脑组织，切取梗死灶旁 0.5 cm 的大脑皮质，提取蛋白，按照每 100 mg 组织加入 1 mL 裂解液的比例加入含有 PMSF 的 RIPA 裂解液，匀浆后 4 ℃静置 2 h 使其充分裂解，在 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 8 min，取上清，采用 Bradford 蛋白检测试剂盒对蛋白定量。将蛋白浓度调节至 4 g/L，在 100 ℃加热器中变性 8 min，轻微离心后储存于 −20 ℃。制备 12%SDS-PAGE，加入缓冲液，100 V 电压分离约 2 h，将 PVDF 膜浸入甲醇中激活 30–60 s，然后转入转膜缓冲液中平衡 5 min，运行 100 V 电压 1 h；PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉在摇床上室温封闭 2 h，PBST 洗膜 3 遍，加入一抗肿瘤坏死因子 α(1 ∶ 1 500，ABclonal)、白细胞介素 6(1 ∶ 1 000，ABclonal)、白细胞介素 1β(1 ∶ 1 000，ABclonal)、Ox-42(1 ∶ 1 000，Abcam)，ACTB(1 ∶ 100 000，ABclonal)，4 ℃孵育过夜，PBST 冲洗 3 次，每次 15 min，加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体 (1 ∶ 500，ABclonal)，室温孵育 1 h，PBST 冲洗 4 次，每次 10 min，用高灵敏度 ECL 化学发光检测试剂盒对蛋白条带进行可视化，多荧光图像分析系统 (Tanon 5200) 进行扫描，使用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.5 主要观察指标 ① Zea Longa 6 级评分方法筛选动物模型大鼠，根据 BBB 评定量表使用双盲法评估观察肢体的协调性；②苏木精 – 伊红染色观察各组海马区微细结构变化；③免疫组化染色检测各组炎症因子和小胶质细胞活化标志蛋白的表达部位；④ Western blot 检测各组炎症因子和小胶质细胞活化标志蛋白的表达量。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析，统计图使用 GraphPad Prism 6.0 绘制。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用单因素方差分析进行多组间比较。当方差齐时，用 Bonferroni 检验进行显著性分析；当方差不齐时，用 Dunnett'sT3 检验进行显著性分析。$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞培养与鉴定结果 接种 2 d 后，细胞开始贴壁生长，见**图 1A**；3 d 后镜下可见许多梭形细胞，见**图 1B**；4 d 或 5 d 出现分散的细胞集落，见**图 1C**，**D**；6 d 后梭形细胞充满培养瓶底部，7 d 后大多数细胞融合。免疫组化染色显示，超过 95% 的细胞呈 CD29 阳性染色，见**图 1E**，**F**。



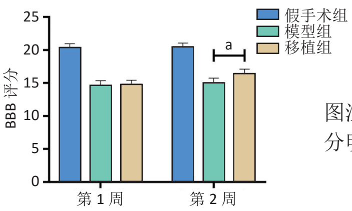
图注：图中 A 为接种 2 d，细胞开始贴壁生长；B 为接种 3 d，可见许多梭形细胞；C，D 为接种 4，5 d，出现分散的细胞集落；E，F 为免疫组化染色，显示超过 95% 的细胞呈 CD29 阳性染色

图 1 | **倒置相差显微镜及免疫组化染色观察骨髓间充质干细胞 (标尺为 20 μm)**

Figure 1 | **Bone marrow mesenchymal stem cells observed by inverted phase contrast microscopy and immunohistochemical staining (scale bar: 20 μm)(× 100)**

2.2 实验动物数量分析 根据 Zea Longa 评分评估大鼠瘫痪肢体的运动功能。模型组和移植组大鼠苏醒后对侧肢体瘫痪，无法站立或不稳定地向前移动，抬起尾巴时身体转向一侧。假手术组大鼠均为 0 级，其余两组 8 只大鼠为 2 级，12 只大鼠为 3 级，均进入结果分析。

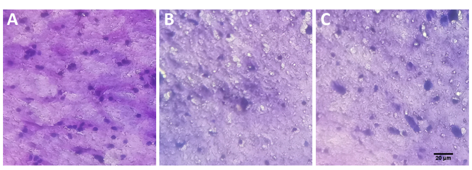
2.3 各组大鼠 BBB 评分 术后，模型组和移植组大鼠对侧肢体立即瘫痪，BBB 评分为 0。术后第 1 周末，模型组和移植组大鼠关节运动次数、运动负荷、伸展范围以及前后肢的协调程度都有一定程度的改善，BBB 评分也逐渐升高，移植组与模型组之间的 BBB 评分无显著差异 ($P > 0.05$)，但是移植组与模型组的 BBB 评分显著低于假手术组 ($P < 0.001$)；术后第 2 周末，移植组 BBB 评分明显高于模型组 ($P < 0.01$)，移植组和模型组的 BBB 评分仍低于假手术组 ($P < 0.001$)，见图 **2**。



图注：术后第 2 周末，移植组 BBB 评分明显高于模型组 ($^aP < 0.01$)

图 2 | 各组 SD 大鼠 BBB 评分结果
Figure 2 | BBB score results in SD rats of each group

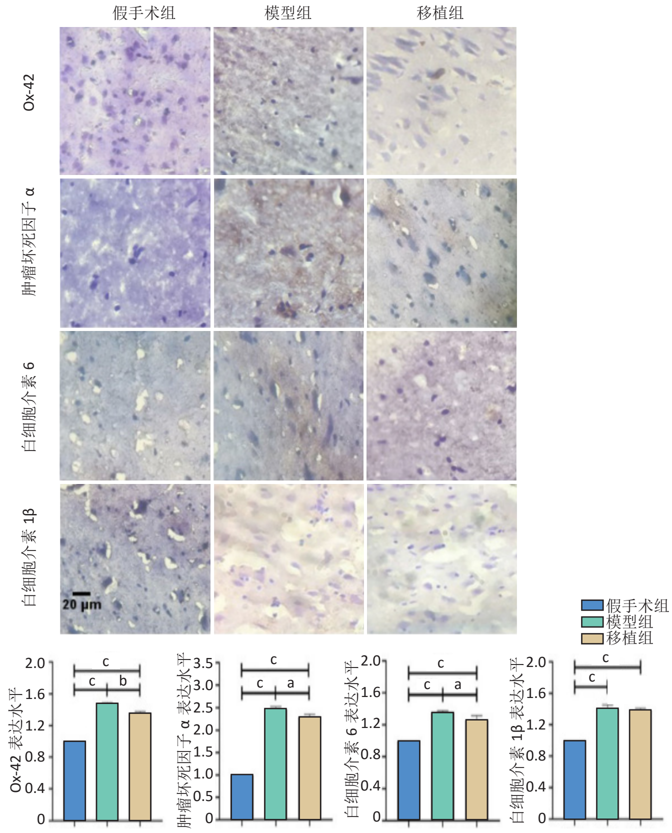
2.4 苏木精 – 伊红染色结果 假手术组皮质神经元正常，神经纤维未见异常，观察到少量神经胶质。模型组大鼠皮质结构不清楚，液化坏死溶解，结构规则破坏，炎症细胞浸润，可见部分胶质细胞，神经元数量减少，一些神经元的细胞核变小，而胞质肥大，细胞质明显减少，小血管和毛细血管充血、水肿、渗出。移植组皮质神经元的形态和结构正常，神经细胞分布相对均匀，可以看到细胞核和丰富的细胞质，在血管周围仍有一些炎症细胞，见图 **3**。



图注：图中 A 为假手术组；B 为模型组；C 为移植组，皮质神经元的形态和结构正常，神经细胞分布相对均匀，可以看到细胞核和丰富的细胞质，在血管周围仍有一些炎症细胞

图 3 | 苏木精 – 伊红染色观察各组 SD 大鼠梗死周围皮质 (标尺为 20 μm)
Figure 3 | Hematoxylin-eosin staining observation of periinfarct cortex of SD rats of each group (scale bar: 20 μm)

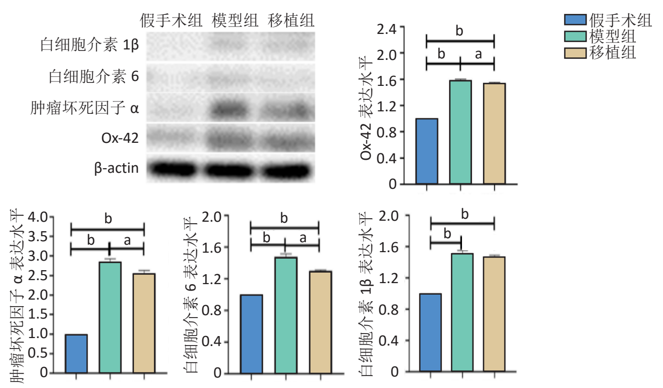
2.5 免疫组化染色结果 与假手术组相比，造模后小胶质细胞活化的特异性标志物 Ox-42 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$)，移植组 Ox-42 蛋白表达水平显著低于模型组 ($P < 0.01$)。模型组肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6、白细胞介素 1β 的表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.001$)，移植组肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 的表达水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)，移植组白细胞介素 1β 的表达水平与模型组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，见图 **4**。



图注：$^aP < 0.05$，$^bP < 0.01$，$^cP < 0.001$

图 4 | 各组 SD 大鼠梗死周围大脑皮质免疫组化染色 (标尺为 20 μm)
Figure 4 | Immunohistochemical staining observation of the periinfarct cerebral cortex of SD rats in the three groups (scale bar: 20 μm)

2.6 免疫印迹结果 造模后小胶质细胞被激活，与假手术组相比，模型组 Ox-42 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.001$)，移植组 Ox-42 蛋白表达水平显著低于模型组 ($P < 0.01$)。模型组大脑皮质中激活的小胶质细胞会影响炎症因子的表达。模型组肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6、白细胞介素 1β 的表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.001$)，移植组肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 的表达水平明显低于模型组 ($P < 0.01$)，移植组白细胞介素 1β 的表达水平与模型组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，见图 **5**。



图注：$^aP < 0.01$，$^bP < 0.001$

图 5 | Western blot 检测各组大鼠大脑皮质 Ox-42、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6、白细胞介素 1β 表达水平
Figure 5 | Expression levels of Ox-42, tumor necrosis factor-α, interleukin-6, and interleukin-1β detected by western blot assay in each group

2.7 生物相容性 各组大鼠均未出现过敏反应、免疫反应及排斥反应，说明骨髓间充质干细胞具有良好的生物相容性。

3 讨论 Discussion

小胶质细胞是中枢神经系统中最小的一种胶质细胞，其胞体小、胞质少、形状细长或椭圆形、分支细小，主要分布在皮质、海马、嗅叶、白质中，占5%–20%，是中枢神经系统的第一道且重要的免疫防御线[17]。小胶质细胞通常处于静止状态，具有胞吞和迁移能力，并监视大脑微环境的变化，识别和去除入侵的病原微生物和外来细胞，迅速消除中枢神经系统中受损的神经元，保持动态平衡并参与宿主的免疫防御[18]。当发生缺血性损伤或炎症刺激时，静止的小胶质细胞会迅速活化，从分支状转化为变形虫样，并具有细胞吞噬、抗原提呈、产生氧自由基、细胞因子和生长因子等功能[19-20]。在该研究中，缺血后小胶质细胞特异性标记物Ox-42的表达水平显著增加，表明小胶质细胞被激活。

活化的小胶质细胞具有双重作用，一方面，吞噬性小胶质细胞去除神经元碎片，并分泌各种抗炎因子来修复神经组织；另一方面，小胶质细胞释放出多种促炎因子和细胞毒性物质[17，21-22]。许多研究表明，当发生缺血性脑卒中时，靠近缺血皮质的小胶质细胞会从静止状态(M0型)变为激活状态(M1型或M2型)[23-24]。M1型小胶质细胞发挥促炎和细胞毒性作用，抑制细胞体轴突分支的生长；另外，经典激活的M1型小胶质细胞通过脂多糖、γ干扰素及粒细胞－巨噬细胞集落刺激因子的诱导[25]，刺激分泌白细胞介素1β、白细胞介素6、白细胞介素12、肿瘤坏死因子α、干扰素γ和其他促炎因子，加速对神经组织的炎症反应损害[26-27]。M2型小胶质细胞抑制过度的炎症反应，促进受损神经元的存活，减少瘢痕的发生，分泌白细胞介素4、白细胞介素10、白细胞介素13、转化生长因子β等抗炎因子，抑制过度的炎症反应，增强吞噬功能[27]。因此，抑制小胶质细胞的M1型活化为促炎性，将活化的M2型转化为抗炎性，以及从M1型转变为M2型可以减少缺血性脑卒中后炎症对神经元的损害[28]。免疫组织化学和蛋白印迹结果表明，周围缺血的小胶质细胞过度活化，并且还增加了大脑皮质炎性因子肿瘤坏死因子α、白细胞介素6、白细胞介素1β的表达。

肿瘤坏死因子α、白细胞介素6、白细胞介素1β是介导炎性反应发生的必要因素，是促炎性细胞因子。在生理条件下，细胞因子参与脑损伤修复和自身免疫过程。在病理状态下，自分泌或协同其他细胞因子产生大量炎性细胞因子。肿瘤坏死因子α主要由巨噬细胞和T淋巴细胞产生，与免疫防御、炎症反应和其他具有广泛生物学特性的多肽细胞因子有关。肿瘤坏死因子α可以激活小胶质细胞并诱导黏附因子和趋化因子的高表达，促进炎性细胞的迁移，这是导致缺血性脑卒中神经元损伤的关键因素。高水平肿瘤坏死因子α导致内皮细胞功能受损，并使周围的炎症细胞通过血脑屏障，促进炎症反应，进一步加重对血脑屏障的损害。在该研究中，肿瘤坏死因子α的表达增加导致运动功能受损，这可能是脑缺血损伤进一步损害中枢神经系统的因素之一[29]。缺血后大脑皮质小胶质细胞激活诱导了白细胞介素6和白细胞介素1β的表达。白细胞介素1β是介导免疫和炎症级联反应的重要因子，与其他细胞因子相互作用，促进脑缺血后B细胞和T细胞活化；白细胞介素1β过表达也可促进其他炎症因子，例如肿瘤坏死因子α、白细胞介素6进一步加重对大脑的伤害[30]。在生理条件下，缺血后大脑皮质中白细胞介素1β的表达相对较低，并在高度致敏时大量增加，引起Ca^{2+}超负荷并刺激内皮细胞表达白细胞黏附因子，增加了缺血皮质的神经毒性[31]。白细胞介素1β还可以激活大脑中的巨噬细胞和内皮细胞产生多种活性物质，从而加剧继发性脑损伤。骨髓间充质干细胞抑制小胶质细胞的过度活化并抑制炎性因子释放，这可以减少对中枢神经系统的伤害程度。

骨髓间充质干细胞发挥的神经保护作用尚未完全了解，几种可能的机制如下：首先，骨髓间充质干细胞可以通过抑制炎症性免疫反应来减少神经毒性物质对中枢神经系统的损害[12]；其次，骨髓间充质干细胞可能分泌大量神经保护因子，以启动中枢神经系统的内源性修复机制，并防止神经组织变性[32]；第三，骨髓间充质干细胞可能通过血脑屏障迁移至病变区域，然后分化为脑细胞，从而取代功能障碍的神经元[33]，这种转分化作用较弱，因为最终到达皮质的骨髓间充质干细胞数量很少。研究表明，小胶质细胞的活化与皮质损伤有关，而骨髓间充质干细胞可能会抑制其过度活化，从而在一定程度上保护大脑皮质免受伤害。

NF-κB是广泛存在于神经元和神经胶质细胞中的转录因子。在生理条件下，NF-κB及其特异性抑制剂IκB抑制其转录功能；当发生缺血性脑卒中时，小胶质细胞释放多种因子，例如肿瘤坏死因子α、白细胞介素6、白细胞介素1β，激活NF-κB途径，然后激活核内基因并在NF-κB进入细胞核之后产生相应的mRNA[34]，促进更多炎性细胞因子的合成和释放，引起一系列炎症反应[35]。因此，NF-κB在缺血性脑卒中后的炎症反应中起着至关重要的作用，骨髓间充质干细胞可能通过干预NF-κB信号通路，抑制小胶质细胞释放一氧化氮、前列腺素E2、白细胞介素1β和白细胞介素6，减少了促炎递质的产生[36]，从而对脑组织起保护作用[22]。

炎症反应是缺血性脑卒中损伤的重要病理因素，其病理变化持续时间长[37]，而脑卒中后神经炎症是影响长期预后的重要因素[38]，与其机制及信号转导相关的因素很多，尚需进一步研究。实验动物与人类之间的免疫系统不同，影响脑损伤的关键因素有待进一步研究，另外，需要更先进的技术和更全面的检测方法来研究预防和保护缺血性脑血管疾病的作用机制。

该实验使用的是第3代骨髓间充质干细胞，并且没有对其他代数细胞进行系统和深入的研究，也没有设置不同细胞数量进行对比。另外，结果仅设置一个时间点，没有对多个时间点进行深入的动态检测，无法获得动态表达的趋势。

作者贡献：实验设计为颜南、杨晓霞，实验实施为伍彦龙、杨天泽、周懋淳和王慧，实验评估为王正东和唐晓慧，资料收集为张笑妍。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金青年科学基金项目(81803200)”“辽宁省科学技术计划项目 (2017225059)”“2020 年度沈阳市中青年科技创新人才支持计划 (RC200238)”及“沈阳医学院科学研究基金 (20161009)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经沈阳医学院动物实验伦理委员会批准，批准号为 SYYXY9030601。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过沈阳医学院生物统计学专家审核。

4 参考文献 References

[1] KERR N, DIETRICH DW, BRAMLETT HM, et al. Sexually dimorphic microglia and ischemic stroke. CNS Neurosci Ther. 2019;25(12):1308-1317.
[2] ZHANG D, LU Z, MAN J, et al. Wnt-3a alleviates neuroinflammation after ischemic stroke by modulating the responses of microglia/macrophages and astrocytes. Int Immunopharmacol. 2019;75:105760.
[3] YAN RY, WANG SJ, YAO GT, et al. The protective effect and its mechanism of 3-n-butylphthalide pretreatment on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017;21(22):5275-5282.
[4] GOMEZ-NICOLA D, PERRY VH. Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. Neuroscientist. 2015;21(2):169-184.
[5] DU L, ZHANG Y, CHEN Y, et al. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. Mol Neurobiol. 2017;54(10):7567-7584.
[6] YEH CF, CHUANG TY, HUNG YW, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition enhances anti-inflammatory and antioxidative processes, modulates microglia polarization, and promotes recovery after ischemic stroke. Neuropsychiatr Dis Treat. 2019;15:2927-2941.
[7] ABDALLAH BM, HAACK-SØRENSEN M, BURNS JS, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. Biochem Biophys Res Commun. 2005;326(3):527-538.
[8] CHAO YH, PENG CT, HARN HJ, et al. Poor potential of proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells derived from children with severe aplastic anemia. Ann Hematol. 2010;89(7):715-723.
[9] SUN LY, HSIEH DK, SYU WS, et al. Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. Cell Prolif. 2010;43(5):445-456.
[10] XIE DM, LI YL, LI J, et al. CD51 distinguishes a subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells with distinct migratory potential: a novel cell-based strategy to treat acute myocardial infarction in mice. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):331.
[11] WEISS JN, LEVY S, BENES SC. Stem Cell Ophthalmology Treatment Study (SCOTS): bone marrow-derived stem cells in the treatment of Leber's hereditary optic neuropathy. Neural Regen Res. 2016;11(10):1685-1694.
[12] WANG X, ZHAI W, ZHU J, et al. Treatment of the bone marrow stromal stem cell supernatant by nasal administration-a new approach to EAE therapy. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):325.
[13] NAKANO M, NAGAISHI K, KONARI N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. Sci Rep. 2016;6:24805.
[14] HAO F, LI A, YU H, et al. Enhanced Neuroprotective Effects of Combination Therapy with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Ginkgo biloba Extract (EGb761) in a Rat Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Neuroimmunomodulation. 2016;23(1):41-57.
[15] LI J, LIU Z, WANG L, et al. Thousand and one kinase 1 protects MCAO-induced cerebral ischemic stroke in rats by decreasing apoptosis and pro-inflammatory factors. Biosci Rep. 2019;39(10):BSR20190749.
[16] NASOUTI R, KHAKSARI M, MIRZAEE M, et al. Trehalose protects against spinal cord injury through regulating heat shock proteins 27 and 70 and caspase-3 genes expression. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2019;31(1):1-8.
[17] QIN C, ZHOU LQ, MA XT, et al. Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. Neurosci Bull. 2019;35(5):921-933.
[18] ELDAHSHAN W, FAGAN SC, ERGUL A. Inflammation within the neurovascular unit: Focus on microglia for stroke injury and recovery. Pharmacol Res. 2019;147:104349.
[19] HEINDL S, GESIERICH B, BENAKIS C, et al. Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. Front Cell Neurosci. 2018;12:106.
[20] SANDVIG I, AUGESTAD IL, HÅBERG AK, et al. Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks. Eur J Neurosci. 2018;47(12):1414-1428.
[21] XIONG XY, LIU L, YANG QW. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. Prog Neurobiol. 2016;142:23-44.
[22] CHEN E, LIU G, ZHOU X, et al. Concentration-dependent, dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38/MAPK and NF-κB signaling pathways. FASEB J. 2018;32(9):4917-4929.
[23] PAN J, JIN JL, GE HM, et al. Malibatol A regulates microglia M1/M2 polarization in experimental stroke in a PPARγ-dependent manner. J Neuroinflammation. 2015;12:51.
[24] LI D, WANG C, YAO Y, et al. mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type. FASEB J. 2016;30(10):3388-3399.
[25] WON S, LEE JK, STEIN DG. Recombinant tissue plasminogen activator promotes, and progesterone attenuates, microglia/macrophage M1 polarization and recruitment of microglia after MCAO stroke in rats. Brain Behav Immun. 2015;49:267-279.
[26] COLLMANN FM, PIJNENBURG R, HAMZEI-TAJ S, et al. Individual in vivo Profiles of Microglia Polarization After Stroke, Represented by the Genes iNOS and Ym1. Front Immunol. 2019;10:1236.
[27] TIAN X, LIU H, XIANG F, et al. β-Caryophyllene protects against ischemic stroke by promoting polarization of microglia toward M2 phenotype via the TLR4 pathway. Life Sci. 2019;237:116915.
[28] WANG J, XING H, WAN L, et al. Treatment targets for M2 microglia polarization in ischemic stroke. Biomed Pharmacother. 2018;105:518-525.
[29] CHEN AQ, FANG Z, CHEN XL, et al. Microglia-derived TNF-α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke. Cell Death Dis. 2019;10(7):487.
[30] LIU Z, RAN Y, HUANG S, et al. Curcumin Protects against Ischemic Stroke by Titrating Microglia/Macrophage Polarization. Front Aging Neurosci. 2017;9:233.
[31] FONFRIA E, MATTEI C, HILL K, et al. TRPM2 is elevated in the tMCAO stroke model, transcriptionally regulated, and functionally expressed in C13 microglia. J Recept Signal Transduct Res. 2006;26(3):179-198.
[32] ZHOU W, LIU Q, XU B. Improvement of bone defect healing in rats via mesenchymal stem cell supernatant. Exp Ther Med. 2018;15(2):1500-1504.
[33] LIN J, WANG C, WU Z. Preliminary study on effects of human brain-derived neurotrophic factor gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells by intravenous transplantation on structure and function of rat injured spinal cord. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2010;24(8):982-987.
[34] WANG W, HUANG X, LI J, et al. Methane Suppresses Microglial Activation Related to Oxidative, Inflammatory, and Apoptotic Injury during Spinal Cord Injury in Rats. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:2190897.
[35] HE Y, MA X, LI D, et al. Thiamet G mediates neuroprotection in experimental stroke by modulating microglia/macrophage polarization and inhibiting NF-κB p65 signaling. J Cereb Blood Flow Metab. 2017;37(8):2938-2951.
[36] 朱婷 , 孙桂波 , 孟祥宝 , 等 . 小胶质细胞 / 巨噬细胞的极化及在脑卒中修复中的作用 [J]. 中国药理学通报 ,2019,35(8):1046-1050.
[37] VON LEDEN RE, KHAYRULLINA G, MORITZ KE, et al. Age exacerbates microglial activation, oxidative stress, inflammatory and NOX2 gene expression, and delays functional recovery in a middle-aged rodent model of spinal cord injury. J Neuroinflammation. 2017;14(1):161.
[38] 樊文香 . 缺血性脑卒中的机制研究进展 [J]. 中国药科大学学报 ,2018,49(6):751-759.

（责任编辑：MZH，ZN，ZH）