

· 论 著 ·

骨髓间充质干细胞颈内动脉移植对 VD 大鼠学习记忆的影响*

王昌铭^{1,2}, 滕军放^{1△}, 姚永杰², 高 唱²

(1. 河南郑州大学第一附属医院神经内科, 郑州 450000;

2. 解放军第一五零医院神经内科, 河南洛阳 471031)

摘要:目的 观察颈内动脉移植骨髓间充质干细胞(BMSCs)透过血脑屏障(BBB)在血管性痴呆(VD)大鼠脑内存活、迁移及对认知能力的影响。方法 分离大鼠股骨骨髓单核细胞,以贴壁培养法培养 BMSCs,分化诱导并作 BrdU 标记;选 72 只 Wistar 大鼠分为对照组、模型组、治疗组 3 组,制作 VD 大鼠模型,治疗组于术后 24 h 颈内动脉移植 0.5 mL 1.2×10^7 /mL 的 BrdU 标记细胞。移植 4、8 周后检测移植细胞在 VD 大鼠脑内存活、迁移以及大鼠学习记忆能力。结果 颈内动脉移植后骨髓间充质干细胞广泛存活于 VD 大鼠脑组织内,随着时间的延长,迁移方向集中,主要聚集至海马、大脑皮质等缺血易损伤区域。移植后 4、8 周,模型组大鼠主动回避反应(AAR)比率[(42.1±4.5)、(43.6±3.6)]低于对照组[(90.0±4.3)、(92.5±5.0)],差异有统计学意义($P<0.01$);治疗组(69.2±4.7,70.8±4.7)较模型组明显提高,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 骨髓间充质干细胞颈内动脉移植后可透过 BBB 向脑缺血易损伤部位迁移聚集、存活,促进颈内动脉移植后骨血损伤后脑组织的修复与再生,明显增强 VD 大鼠学习记忆能力。

关键词:间质干细胞移植;骨髓颈内动脉;痴呆,血管性;细胞运动;学习记忆

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)36-4364-04

The effects of intracarotid transplantation of bone marrow stem cells on learning memory abilities in the brain of VD rats*

Wang Changming^{1,2}, Teng Junfang^{1△}, Yao Yongjie², Gao Chang²

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China;

2. Department of Neurology, the 150th Hospital of Chinese PLA, Luoyang, Henan 471031, China)

Abstract: Objective To observe the survival and migration characteristics after intracarotid transplantation of bone marrow stem cells(BMSCs) and its effect on learning-memory abilities across the blood-brain barrier(BBB) in the vascular dementia(VD) rats. **Methods** Bone mononuclear cells(BMNCs) were isolated from bone marrow in vitro by standard Ficoll-Hypaque technique, then cells were enriched and expanded by using bone marrow adherent culture. 72 Wistar rats were meanly divided into control group, model group and treatment group. The VD rat model was established by modified pulsineilis 4-vessel occlusion(4 VO). The treatment group received intracarotid infusion of 0.5 mL 1.2×10^7 /mL BMSCs which were labeled with BrdU in vitro after operation. Their survival, migration and the learning-memory abilities were observed at 4th and 8th week. **Results** BMSCs transplanted by intracarotid transplantation survived and had been found throughout the brain tissue. They major migrated and localized in the ischemic zone of injury such as hippocampus and cerebral cortex. Compared with the control group, active avoidance response(AAR) ratio in the model group(42.1±4.5), group(43.6±3.6) showed significantly decrease compared with the control group(90.0±4.3), (92.5±5.0) ($P<0.01$), and the treatment group(69.2±4.7), (70.8±4.7) was significant higher than the model group($P<0.01$). **Conclusion** Intracarotid transplantation of BMSCs could enter the VD rats cerebra parenchyma via BBB, migrate into the damaged brain tissue to gather and survive. Learning-memory abilities can be improved significantly by transplanted BMSCs.

Key words: mesenchymal stem cell trans plation; bone marrow intracarotid; dementia, vascular; cell movement; learning-memory

目前,血管性痴呆(vascular dementia, VD)尚无有效的治疗方法。随着神经干细胞(NSCs)研究的不断深入,人们不断探索应用细胞移植来治疗神经系统疾病^[1]。以往 NSCs 多来自于胚胎、成体中枢神经组织,操作繁琐,且增殖和分化等受诸多因素的调控,并存在免疫排斥及社会、伦理和法律等诸多问题,其临床应用受到了很大限制^[2]。近年来从骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)和造血干细胞(HSCs)中可诱导分离出 NSCs,并分化为神经元和神经胶质细胞^[3-8]。本研究颈内动脉移植 BMSCs 后观察移植细胞是否可透过 VD 大鼠血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)在脑实质内存活、迁

移及其对行为功能恢复,为临床 VD 的细胞移植治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制作 以穿梭箱试验筛选学习记忆良好的老龄(18~24 月龄)Wistar 大鼠 72 只[第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)20030003],雌雄不限,体质量(300±50)g。VD 大鼠模型制作参照文献 Pulsinellis 4VO 改良法,先烧灼双侧椎动脉,24 h 后再反复阻断双侧颈总动脉,每次 5 min,间隔 1 h,共 3 次,对照组除不烧灼双侧椎动脉,不夹闭双侧颈总动脉外,其余处理同 Pulsinellis

* 基金项目:军队“十一五”科技攻关项目(06G076)。 作者简介:王昌铭(1972~),博士,主任医师,主要从事血管性痴呆的研究。

△ 通讯作者, Tel:13838210077; E-mail: tjf.6666@yahoo.com.cn。

4VO 改良法。大鼠分为对照组进行模型制作、模型组和治疗组;每组又分为 4、8 周两个时相点,每时相点 12 只。治疗组于术后 24 h 颈内动脉输注 BrdU 标记的 BMSCs,浓度为 $1.2 \times 10^7/\text{mL}$,注射剂量为 0.5 mL;对照组和模型组输注等量生理盐水。

1.2 仪器与试剂 IMEM 培养基、胎牛血清(美国 GIBCO 公司),淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司),5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、小鼠抗 BrdU 抗体、琼脂糖和二乙基焦碳酸酯(diethylprocarbonate,DEPC)水(美国 Sigma 公司),磷酸盐缓冲液(PBS)粉剂、免疫组织化学试剂盒和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司)、光学显微镜、倒置显微镜(日本 Olympus 公司)等。

1.3 方法

1.3.1 骨髓间充质干细胞的提取、分离、培养和扩增 无菌条件下,采集幼年雄性清洁 Wistar 大鼠股骨的骨髓,沉降红细胞。吸上清液离心,弃上清液,用 PBS 制成单核细胞悬液,叠加到相对密度 1.077 的淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 20 min,取界面层,加 PBS 制成单核细胞悬液,离心洗涤 3 次,弃上清;所得单核细胞在 37℃、5% CO₂ 培养箱中原代培养,用倒置显微镜观察细胞形态的改变,约 3 d 换液 1 次,弃去非贴壁细胞。当培养的细胞相互融合达到 80%~90%,用 0.25%胰酶消化使之成为单细胞悬液,传代培养。

1.3.2 骨髓间充质干细胞 BrdU 标记和细胞移植 取体外扩增至 3~4 代的 MSCs,以 $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$ (T 25 培养瓶)的密度接种于含有 20% 胎牛血清的 IMEM 培养液(Hyclone 公司)中,加入 20 ng/mL 神经生长因子(NGF)、全反式维甲酸(RA)^[9]基础上,加入 BrdU 使浓度为 5 μmol/L,培养 48 h,收集 BrdU 标记细胞,加 PBS 制成单细胞悬液,离心洗涤 3 次,弃上清液。所得 MSCs 经台盼蓝染色、光学显微镜下计数,调整

至适当细胞密度($6 \times 10^6/\text{mL}$)备用。

1.3.3 穿梭箱检查 采用第三军医大学野战外科研究所研制的微机控制的穿梭箱系统。该系统以灯光为条件刺激,足底电击为非条件刺激。如大鼠在灯光刺激后即能完成穿梭动作为主动回避反应(active avoidance response,AAR),经电刺激才能完成穿梭动作为被动回避反应(passive avoidance respmse,PAR),不能完成穿梭动作为失败。大鼠的学习记忆能力以完成 AAR 的次数与测试总次数(20 次)的比值即 AAR 比率(%)代表。术前大鼠行 7 d 穿梭箱训练,以 AAR 比率大于或等于 80%为入选标准率,<80%者淘汰;术前、术后 4、8 周穿梭箱检查。

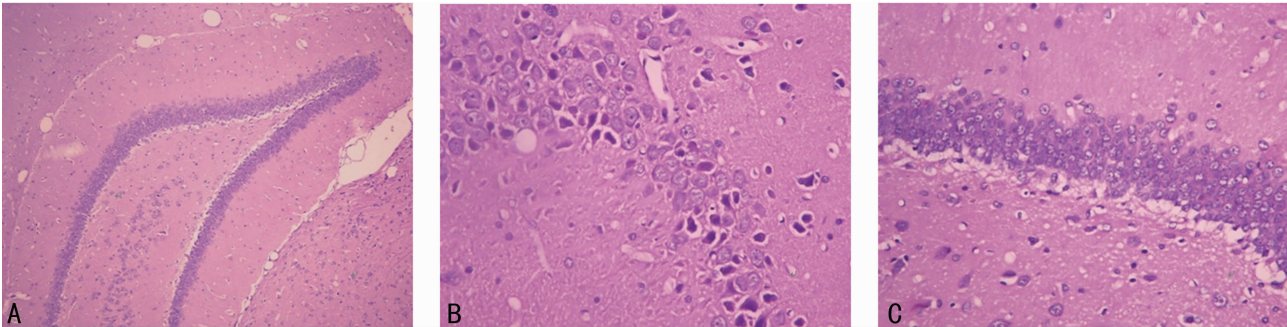
1.3.4 病理学和免疫组织化学分析 各组术后 4、8 周时随机选取 6 只大鼠,用 4%多聚甲醛灌注,断头取脑,冰冻切片,片厚 12 μm,采取冠状切片。每 5 片取 1 片,用于 HE 染色作病理分析;剩余进行 BrdU 免疫组织化学分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

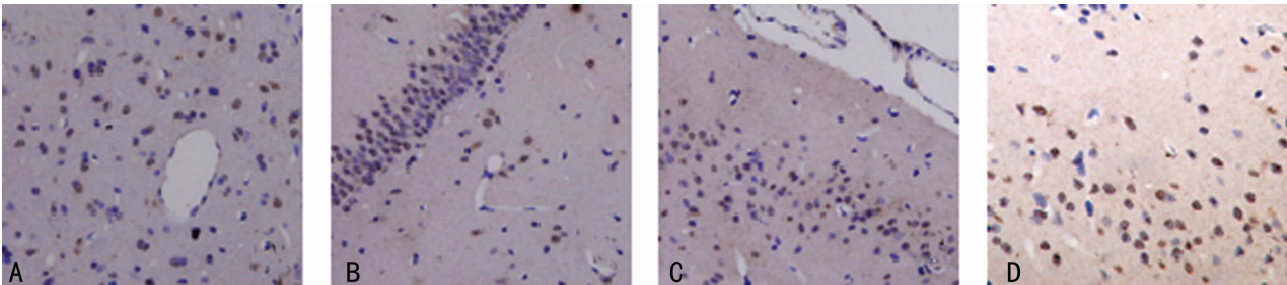
2 结 果

2.1 细胞移植对 VD 大鼠学习记忆的影响 模型组 4、8 周 AAR 与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),而治疗组较模型组有显著性改善($P < 0.01$),见表 1。

2.2 脑组织病理学改变 对照组大鼠脑组织皮层细胞形态、结构正常;海马锥体细胞 2~3 层,排列紧密,细胞核大而圆,核仁清楚。模型组脑组织呈慢性弥漫性损伤,以海马及大脑皮质区为主;光镜下见海马、大脑皮质有部分神经细胞核固缩、碎裂、溶解、变性、坏死或消失,有炎症细胞浸润,胶质细胞增生。治疗组神经细胞变性、坏死数量减少,程度明显减轻,见图 1。



A:对照组(×100);B:模型组海马区(×400);C:治疗组(×400)。
图 1 脑组织海马区病理学改变图(HE 染色)



A:血管周围 BMSCs;B:海马区 BMSCs;C:大脑皮质区 BMSCs;D:BMSCs 在脑组织存在的内局灶聚集现象。
图 2 脑实质移植细胞组织病理学图(免疫组织化学×400)

表 1 各组大鼠不同时相点 AAR 比率(̄x±s, %)

组别	术前(n=24)	术后 4 周(n=12)	术后 8 周(n=12)
对照组	91.2±5.3	90.0±4.3	92.5±5.0
模型组	91.1±4.4	42.1±4.5 ^a	43.6±3.6 ^a
治疗组	92.5±5.3	68.6±4.7 ^{ab}	70.6±4.7 ^{ab}

^a: P<0.01, 与对照组比较; ^b: P<0.01, 与模型组比较。

2.3 脑实质的移植细胞免疫组织化学检测 移植后 4 周, 脑组织石蜡切片免疫组织化学检测, DAB 显色进入脑实质的骨髓间充质干细胞, 其细胞核呈棕黄或黄褐色(BrdU 阳性细胞)。移植细胞在 VD 大鼠脑实质中广泛分布, 富含血管区域多, 围绕在血管周围; 随着时间的延长, 迁移方向集中, 主要聚集至海马、大脑皮质等缺血易损伤区域, 并有局灶聚集现象, 在 VD 大鼠脑内存活至少 8 周以上, 见图 2。

3 讨 论

VD 是以脑血管疾病引起的学习记忆障碍为主要表现的一种疾病。临床病理基础是多发性脑梗死和皮层下动脉硬化性脑病, 其常见病因是慢性脑灌注不足。本实验采用 Pulsinellis 4VO 改良法反复夹闭双侧颈总动脉造成脑组织反复缺血再灌注, 烧灼双侧椎动脉永久性闭塞造成长期慢性脑灌注不足, 使海马等记忆相关部位受损, 导致认知功能减退。该模型高度模拟了 VD 发病特点, 且缺血后生理指标稳定, 病理改变充分、明确, 无明显肢体运动障碍, 是较理想 VD 动物模型, 可利用其研究 VD 的发病机制、干预治疗、药物筛选及评价。

因脑缺血选择性易损伤, 大脑皮层、丘脑、海马、纹状体都是对缺血损伤敏感的区域, 其中海马区最为敏感。而海马与学习记忆密切相关, 损伤海马直接影响信息贮存和回忆。本研究从大鼠股骨中以密度梯度离心法与贴壁法分离扩增、诱导分化并 BrdU 标记 BMSCs, 通过颈内动脉输注 VD 大鼠体内, 观察到移植细胞在脑内广泛分布, 血管丰富区域多, 围绕血管周围, 并有局灶聚集现象; 随着时间的延长, 迁移方向集中, 主要聚集至海马、大脑皮质等缺血易损伤区域, 至少存活 8 周以上。表明 BMSCs 可透过 BBB 在脑内存活, 并沿着一定的路线迁移聚集至脑缺血易损伤部位。移植细胞集中聚居区域与组织病理学上脑缺血损伤最严重部位相一致, 如海马、大脑皮质, 其定向迁移的发生考虑是由于脑内黏附分子(如 ICAM-1、VCAM、E-selectin 等)的显著上调和一些化学物质及趋化因子(IL-8、单核细胞趋化蛋白-1、巨噬细胞炎症蛋白 1α)的释放所致^[10-11]。再者, 海马本是成体干细胞的相对富集区, 损伤后神经递质、神经营养因子、细胞因子浓度发生变化, 有着适合移植入的干细胞生长、分化为神经细胞的微环境, 能使移植的 MSCs 定居、分化并修复损伤的神经组织, 恢复相关神经功能。

本实验观察到 BMSCs 输注后 4、8 周时治疗组大鼠脑内神经细胞变性、坏死数量较模型组减少, 程度明显减轻, AAR 比率也显著提高(P<0.01)。表明外源性骨髓干细胞可明显缓解脑缺血后神经细胞损伤, 对神经元和神经胶质细胞起到有效的保护作用, 并显著改善 VD 大鼠学习记忆能力。至于 BMSCs 在脑内微环境下影响损伤神经元功能重组或重建的机制, 则可能与显著改善胆碱能系统功能外、移植细胞在脑内诱导分化后与周围环境中的神经细胞建立有生物功能的突触联系, 上调脑组织多种神经营养因子如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、脑源性神经(NGF)生长因

子表达, 促进受损神经元的修复、再生, 保护有功能的新生神经元及成熟神经元以免发生迟发性凋亡, 参与脑血管重建, 诱导血管再生等有关^[11-12]。国内外研究表明, BMSCs 中存在巢蛋白(Nestin)阳性细胞, 其比例约占细胞总数的 50% 以上^[13-16]。这些具有神经干细胞特性的细胞可能在 BMSCs 治疗 VD 中起到了一定的作用^[17]。BMSCs 经体外诱导后可产生神经功能最基本的神经生理解剖结构突触联系^[18]。文献也报道, 诱导后 BMSCs 具备去甲肾上腺素分泌功能, 调控跨越其表面膜的离子流而产生电信号。γ-氨基丁酸(GABA)能促进神经前体细胞的成熟和迁移, 而 BMSCs 可表达神经细胞 GABA 受体^[19]。陈剑荣等^[20]用 BDNF 和 RA 对 BMSCs 进行培养诱导, 12 d 时见大而圆的细胞, Nestin 抗原阳性; 20 d 可见长突起神经元样细胞, 神经元特异性核蛋白(NeuN)检测阳性; 14、20 d 的神经元样细胞及培养液均可检测到 5-羟色胺且随时间增加其浓度也相应增加。BMSCs 神经突触生理结构突触的形成和神经递质的分泌在治疗 VD 中的确切作用和机制, 有待进一步研究。

综上所述, 骨髓干细胞体外贴壁生长获得 BMSCs, 诱导分化后高表达 Nestin、NeuN 及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)^[3-8]。本实验表明, 颈内动脉移植的 BMSCs 可透过 BBB 在损伤脑组织中存活、迁移, 促进缺血损伤后脑组织的修复与再生, 显著改善神经功能缺失, 明显增强 VD 大鼠学习记忆能力。因此, 是理想的移植治疗脑卒中、VD 等神经系统疾病以及其他损伤性、遗传缺陷性或退行性疾病的种子细胞。

参考文献:

[1] Tao H, Rao R, Ma DD, et al. Cytokine induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell free condition[J]. Dev Growth Differ, 2005, 47(6): 423-433.

[2] Binle E, Chau DY, Alexander MR, et al. The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles [J]. Biomaterials, 2009, 30(16): 2985-2994.

[3] Long X, Olszewski M, Huang W, et al. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(1): 65-69.

[4] Rivera FJ, Sierralta WD, Minguell JJ, et al. Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells [J]. Neurosci Lett, 2006, 406(1/2): 49-54.

[5] Yang H, Xia Y, Lu SQ, et al. Basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of mouse bone marrow stromal cells requires FGFR-1, MAPK/EPK, and transcription factor AP-1[J]. J Biol Chem, 2008, 283(9): 5287-5295.

[6] Delcroix GJR, Curtis KM, Schiller PC, et al. EGF and BMP-4 pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells [J]. Differentiation, 2010, 80(4-5): 213-227.

[7] Mihaela C, Simona OD, Cosmin IS, et al. In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem

- cells under differential exposure to liver-specific factors [J]. *Translat Res*, 2009, 154(3): 122-132.
- [8] Liu L, Hu J, Sun B, et al. Mesenchymal stem cells inhibition of chronic ethanol-induced oxidative damage via up-regulation of phosphatidylinositol-3-kinase 1/2 activation in PC12 cells and neurons [J]. *Neuroscience*, 2010, 167(4): 1115-1124.
- [9] Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, et al. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells [J]. *Glia*, 2002, 39(3): 229-336.
- [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 [J]. *Brain Res*, 2004, 1016(2): 145-153.
- [11] Zhang H, Huang Z, Xu Y, et al. Differentiation and neurological benefit of the mesenchymal stem cells transplanted into the rat brain following intracerebral hemorrhage [J]. *Neurol Res*, 2006, 28(1): 104-112.
- [12] Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 456(3): 120-123.
- [13] 王亚柱, 邓宇斌, 甘丹卉, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞定向分化为神经元的实验研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2008, 29(4): 383-387.
- [14] Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms [J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(5): 1024-1035.
- [15] Long X, Olszewski M, Huang W, et al. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Dev*, 2005, 14(1): 65-69.
- [16] Zurita M, Vaquero J, Oya S, et al. Neurotrophic Schwann-cell factors induce neural differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *Neuroreport*, 2007, 18(16): 1713-1717.
- [17] 高唱, 王景周, 范文辉, 等. 静脉注射骨髓间充质干细胞对血管性痴呆模型大鼠认知障碍的影响 [J]. *中华老年医学杂志*, 2004, 23(11): 808-812.
- [18] Chen JR, Jiang XD, Xu RX, et al. Biochemical properties of norepinephrine as a kind of neurotransmitter secreted by bone marrow-derived neural stem cells induced and differentiated in vitro [J]. *Neural Regen Res*, 2006, 12(5): 111-114.
- [19] 许燕, 段萍, 吴素霞, 等. 人骨髓间充质干细胞分化神经样细胞转录 GABA 受体 mRNA [J]. *基础医学与临床*, 2008, 28(3): 275-278.
- [20] 陈剑荣, 姜晓丹, 邹雨汐, 等. 兔骨髓源性神经干细胞分化为成熟神经元样细胞的特征研究 [J]. *中国临床康复杂志*, 2004, 8(16): 3042-3043.

(收稿日期: 2013-05-18 修回日期: 2013-07-30)

(上接第 4363 页)

- Gut, 2011, 60(11): 1606-1607.
- [3] van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, et al. Expression of an ASCL2 related stem cell signature and IGF2 in colorectal cancer liver metastases with 11p15.5 gain [J]. *Gut*, 2010, 59(9): 1236-1244.
- [4] Jubb AM, Chalasani S, Frantz GD, et al. Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signaling and is upregulated in intestinal neoplasia [J]. *Oncogene*, 2006, 25(24): 3445-3457.
- [5] Zhu R, Yang Y, Tian Y, et al. Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by microRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32170.
- [6] Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG, et al. Down-Regulation of the microRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(2): 180-191.
- [7] Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis [J]. *Gut*, 2013, 62(9): 1315-1326.
- [8] Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, et al. Dynamic epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2012, 31(16): 2062-2074.
- [9] Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 265-273.
- [10] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133(4): 704-715.
- [11] Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, et al. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data [J]. *Plos one*, 2009, 4(4): e5279.
- [12] Kim T, Veronese A, Pichiorri F, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2 [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(5): 875-883.
- [13] Johnson JE, Birren SJ, Saito T, et al. DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(8): 3596-3600.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-18)