

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.14.014

肾脑复元汤联合人脐带间充质干细胞移植对大脑中动脉缺血再灌注模型大鼠炎症因子的影响

李映辰¹, 周建大¹, 胡国恒^{2*}

(1. 中南大学湘雅三医院, 湖南省长沙市河西岳麓区桐梓坡路 138 号, 410013; 2. 湖南中医药大学第一附属医院)

摘要 目的 探究肾脑复元汤联合人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)移植治疗缺血性中风的可能机制。方法 将 75 只大鼠随机分为假手术组、模型组、中药组、干细胞组、联合组各 15 只,除假手术组外其余各组建立大脑中动脉缺血再灌注模型,造模后第 1 天中药组和联合组给予肾脑复元汤 11.6 g/kg 灌胃,假手术组、模型组、干细胞组予 10 ml/kg 蒸馏水灌胃,每天 1 次,共 15 天;干细胞组和联合组造模后第 1 天尾静脉缓慢注射 1×10^6 个 hUC-MSCs。分别于术前 24 h、术后 2 h 及术后第 4、8、15 天进行神经功能评分;分别于第 4、8、15 天时采用 TUNEL 染色标记凋亡细胞,检测血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 10 (IL-10) 的表达。结果 与模型组相比,中药组(第 8、15 天)、干细胞组及联合组(第 4、8、15 天)大鼠神经功能评分降低,凋亡细胞数减少,IL-1 β 、IL-6 表达降低,IL-10 表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与中药组比较,联合组第 4、8 天 TNF- α 表达降低($P < 0.05$);与中药组及干细胞组比较,联合组第 8 天时 IL-1 β 、IL-6 表达降低,第 8、15 天时神经功能评分降低、凋亡细胞数减少、IL-10 表达升高($P < 0.05$)。结论 肾脑复元汤联合 hUC-MSCs 移植可促进大脑中动脉缺血再灌注大鼠神经功能修复,其机制可能与调节炎症反应有关。

关键词 缺血性中风; 脑缺血再灌注; 人脐带间充质干细胞; 肾脑复元汤; 炎症因子

自从神经干细胞分化、神经元新生现象在成人脑组织中被发现以来,具备潜在的通过增殖分化修复损伤脑组织的干细胞技术迅速吸引了科学界的广泛关注。人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)来源于新生儿的脐带,其来源广泛、无伦理限制、增殖分化能力旺盛,并已经实验和临床研究证实具有较好的脑缺血后神经保护作用^[1]。同时,临床应用和实验研究中也验证了中医药改善神经功能的疗效,有望为中风的的治疗提供有效的方案^[2]。肾脑复元汤是我们临床验方,前期研究已经证实其可以显著改善中风患者神经功能,降低致残率^[3],并初步发现其作用机制与促进缺血性损伤后脑内神经营养因子分泌有关^[4]。本研究采用肾脑复元汤联合 hUC-MSCs 移植治疗缺血性中风模型大鼠,并从炎症分子表达调控方面探讨其疗效机制,为中风的临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 2 月龄 SD 大鼠 75 只,体重(280 ± 20) g,购自长沙天勤生物实验动物公司,实验动物许可证号:SYXK(湘)2014-0011,SYXK(湘)2009-0001。

1.2 人脐带

健康新生儿脐带由湖南中医药大学第一附属医院产科提供,由产妇知情同意,并且通过该院实验伦理委员会批准,批准号 2016-S115。

1.3 实验药物

肾脑复元汤:熟地黄 10 g,山萸肉 10 g,山药 15 g,黄芪 30 g,红景天 20 g,牡丹皮 10 g,当归尾 10 g,赤芍 10 g,地龙 10 g,丹参 10 g,川芎 10 g,药材购自湖南中医药大学第一附属医院,通过电子中药煎药机(华康宏力医疗器械公司,型号 BY-BL200 III)煎煮,每剂中药煎煮浓缩成药液 50 ml,4℃ 保存。

基金项目:国家自然科学基金(81273751,81573941)

* 通讯作者: hugh9198@163.com, (0731) 85670760

1.4 主要仪器和试剂

Galaxy170R 型培养箱 (美国 New Brunswick 公司), IX71 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), AriaTM II 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。间充质干细胞 (MSCs) 表型检测流式抗体 (美国 BD 公司, 批号 562530); 胰酶、II 型胶原酶、阿尔新蓝 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 C2674、T7309、O0625), DMEM/F12、FBS、MSCs 分化培养液 (美国 Gibco 公司, 批号分别为 SH30026、10099、25200), 茜素红、油红 O (美国 Amresco 公司, 批号分别为 9436、0298), TUNEL 染色、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 10 (IL-10) 检测试剂盒 (武汉博士德公司, 批号分别为 MK1020、EK0525、EK0393、EK0412、EK0418)。

1.5 hUC-MSCs 的培养和鉴定

参考文献 [1] 培养 hUC-MSCs 并对其进行表面抗原及分化能力鉴定。1) 原代培养: 收集新生儿脐带, 将脐带外膜和血管去除, 将剩下的胶状组织剪成 $3 \sim 4 \text{ mm}^3$ 大小, 用 0.125% 浓度的胰蛋白酶和 2 mg/ml 的 II 型胶原酶在 37°C 下消化 30 min, FBS 终止消化后筛网过滤, 2000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 10% FBS + 90% DMEM/F12 培养基重悬, 以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种在培养瓶内, 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续孵育, 隔 4 天换液 1 次, 7 ~ 10 天后可见梭形细胞贴壁、增殖。2) 流式鉴定: 取 5 代以前的细胞, 0.25% 胰酶消化 2 min, 2000 r/min 离心 5 min, 100 μl PBS 和 5 μl 流式抗体重悬混匀细胞沉淀, 常温孵育 20 min, 加入 100 μl PBS 混匀, 上机检测。3) 分化鉴定: 取 5 代以前的细胞, 待细胞融合度达到 60%, PBS 漂洗 2 次, 分别加入成骨、成脂 MSCs 分化培养液, 3 天换液 1 次, 2 ~ 3 周后可以观察到细胞形态学的变化, 之后分别用茜素红、油红 O 染色, 鉴定分化后细胞。

1.6 模型制备

使用改良 Zea Longa 法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型 [2], 大鼠造模后采用 5 分制神经功能量表 [3] 筛选合格模型, 取评分为 1 ~ 3 分者进行后续实验。

1.7 实验分组与干预

75 只大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、中药组、干细胞组、联合组, 每组 15 只。除假手术组外其余各组建立大脑中动脉缺血再灌注

模型, 假手术组只分离组织不插线栓。造模完成后第 1 天中药组和联合组给予肾脑复元汤 10 ml/kg (含生药 11.6 g/kg) 灌胃, 假手术组、模型组、干细胞组予 10 ml/kg 蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 共 15 天; 干细胞组和联合组大鼠在造模完成后第 1 天, 通过尾静脉缓慢注射 1×10^6 个 hUC-MSCs (0.5 ml PBS 重悬), 完成后再注射 0.5 ml PBS, 其余各组大鼠同时尾静脉注射 1 ml PBS。

1.8 观察指标及方法

1.8.1 神经功能检测 分别于术前 24 h、术后 2 h 及术后第 4、8、15 天采用随机数字表法选取 5 只大鼠, 使用神经功能评分量表 [4], 从肢体活动、感觉状态、平衡姿势 3 个维度进行评分, 总积分区间为 0 ~ 18 分, 分值越大代表神经功能越差。

1.8.2 脑组织细胞凋亡检测 采用 TUNEL 染色标记凋亡细胞: 术后第 4、8、15 天时每组取材 5 只大鼠, 麻醉处死取出端脑, 多聚甲醛固定 1 天, 常规脱水、石蜡包埋; 石蜡切片机在端脑前囟后 1.0 ~ 1.5 mm 范围内做冠状位石蜡切片, 厚度 2 μm ; 切片脱蜡后, 5% BSA 封闭, 滴加 TUNEL 混合液, 常温孵育 90 min, POD 孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染。光镜下观察, 胞核被染成棕黄色是凋亡细胞的表现。每只大鼠检测 1 张切片, 每张切片分别选取缺血侧皮层 5 个互不重叠视野, 用 IPP 6.0 软件测定平均吸光度值, 凋亡细胞多, 则吸光度值高。

1.8.3 血清炎症因子检测 术后第 4、8、15 天每组取材 5 只大鼠。腹主动脉采血 5 ml, 4000 r/min 离心 20 min, 上清液用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL- 1β 、IL-6、IL-10 的表达, 检测步骤按试剂盒说明书进行。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析, 计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验进行两组间比较, 多组比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hUC-MSCs 的培养和鉴定

酶消化法培养 hUC-MSCs, 细胞接种后 7 天, 可见梭形细胞贴壁生长, 但大小尚不均一, 立体感不强, 传代后细胞增殖旺盛, 大小均一, 呈漩涡样或簇状生长, 立体感极强; 取第 4 代细胞, 采用流式细胞技术检测 hUC-MSCs 表面抗原, 可见该细胞高表达 CD90 (100%)、CD105 (99.6%)、CD73 (99.6%), 不表达 CD34; 经过诱导后, 可向成骨

细胞、脂肪细胞分化,说明该细胞符合 hUC-MSCs 鉴定标准。

2.2 各组大鼠不同时间神经功能评分比较

表 1 示, 各组大鼠在术前 24 h 时神经功能评分均为 0 分, 假手术组在各时间点评分亦均为 0 分, 而其余各组从术后 2 h 时开始神经功能评分均明显升高。与模型组同时间比较, 干细胞组和联合组术后第 4、8、15 天神经功能评分均明显降低, 中药组术后第 8、15 天评分亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 并且中药组和干细胞组术后第 8、15 天神经功能评分高于同时间联合组 ($P < 0.05$)。中药组和干细胞组各时间组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠不同时间血清炎症因子水平比较

表 2 示, 与假手术组同时间比较, 模型组第 4、8 天时大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 水平均升高, 第 15 天时仅 TNF- α 、IL-6 水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中药组、干细胞组和联合组第 4、8 天时大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 水平均不同程度升高, 第 15 天时 IL-6 低于同时间假手

术组、IL-10 高于同时间假手术组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组同时间比较, 中药组第 8、15 天和干细胞组、联合组第 4、8、15 天时大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低, 而 IL-10 水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与中药组同时间比较, 干细胞组第 4 天和联合组第 4、8 天时 TNF- α 水平降低, 联合组第 8 天时 IL-1 β 、IL-6 水平亦较同时间中药组降低 ($P < 0.05$), 干细胞组第 4 天及联合组第 4、8、15 天 IL-10 表达均升高 ($P < 0.05$)。与干细胞组同时间比较, 联合组第 8 天时 IL-1 β 、IL-6 水平降低, IL-10 表达升高, 联合组第 15 天时 IL-10 表达亦升高 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠不同时间脑组织细胞凋亡结果比较

表 3 示, 与假手术组同时间比较, 其余各组不同时间脑组织细胞凋亡 TUNEL 染色吸光度值显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组同时间比较, 干细胞组和联合组在第 8 和第 15 天时吸光度值显著降低, 而中药组仅在第 15 天时显著降低 ($P < 0.01$); 联合组在第 15 天时吸光度值显著低于同时间的中药组和干细胞组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间神经功能评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术前 24 h	术后 2 h	术后第 4 天	术后第 8 天	术后第 15 天
假手术组	5	0	0	0	0	0
模型组	5	0	9.88 $\pm$ 1.25	8.80 $\pm$ 1.92	7.21 $\pm$ 1.56	4.14 $\pm$ 1.64
中药组	5	0	9.75 $\pm$ 1.33	8.21 $\pm$ 1.66	5.01 $\pm$ 1.24 ^{*Δ}	2.76 $\pm$ 1.03 ^{*Δ}
干细胞组	5	0	9.90 $\pm$ 1.38	6.05 $\pm$ 1.70 [*]	5.12 $\pm$ 1.14 ^{*Δ}	2.74 $\pm$ 1.02 ^{*Δ}
联合组	5	0	9.82 $\pm$ 1.14	5.89 $\pm$ 1.44 [*]	3.48 $\pm$ 1.12 ^{**}	1.14 $\pm$ 1.11 ^{**}

注: 与模型组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与联合组同时间比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠不同时间血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 水平比较 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10
假手术组	第 4 天	5	33.23 $\pm$ 2.28	101.2 $\pm$ 8.5	90.7 $\pm$ 8.5	38.15 $\pm$ 3.28
	第 8 天	5	34.55 $\pm$ 4.53	95.7 $\pm$ 7.8	86.9 $\pm$ 5.7	36.55 $\pm$ 4.53
	第 15 天	5	35.40 $\pm$ 3.21	97.1 $\pm$ 7.2	88.1 $\pm$ 5.3	35.40 $\pm$ 5.21
模型组	第 4 天	5	67.69 $\pm$ 5.12 ^{**}	159.7 $\pm$ 8.1 ^{**}	138.6 $\pm$ 8.8 ^{**}	57.33 $\pm$ 3.17 ^{**}
	第 8 天	5	55.71 $\pm$ 4.55 ^{**}	124.8 $\pm$ 10.5 ^{**}	118.5 $\pm$ 8.3 ^{**}	45.71 $\pm$ 4.56 ^{**}
	第 15 天	5	44.32 $\pm$ 4.71 ^{**}	102.5 $\pm$ 6.9	93.4 $\pm$ 8.3 [*]	34.32 $\pm$ 4.81
中药组	第 4 天	5	64.55 $\pm$ 5.13 ^{**}	154.5 $\pm$ 8.9 ^{**}	130.8 $\pm$ 8.2 ^{**}	60.25 $\pm$ 3.41 ^{**}
	第 8 天	5	48.95 $\pm$ 5.17 ^{**Δ}	114.1 $\pm$ 8.3 ^{**Δ}	108.1 $\pm$ 6.1 ^{**Δ}	51.22 $\pm$ 3.88 ^{**Δ}
	第 15 天	5	37.96 $\pm$ 3.88 ^{Δ}	93.1 $\pm$ 7.6 ^{Δ}	81.9 $\pm$ 6.1 ^{**Δ}	41.01 $\pm$ 5.07 ^{**Δ}
干细胞组	第 4 天	5	61.13 $\pm$ 4.87 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}	148.3 $\pm$ 8.5 ^{**Δ}	127.8 $\pm$ 7.3 ^{**Δ}	65.43 $\pm$ 3.49 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}
	第 8 天	5	46.13 $\pm$ 5.13 ^{**Δ}	113.1 $\pm$ 7.1 ^{**Δ}	107.6 $\pm$ 7.3 ^{**Δ}	52.13 $\pm$ 5.02 ^{**Δ}
	第 15 天	5	38.35 $\pm$ 3.71 ^{Δ}	92.8 $\pm$ 7.1 ^{Δ}	83.1 $\pm$ 7.5 ^{**Δ}	40.69 $\pm$ 4.81 ^{**Δ}
联合组	第 4 天	5	60.81 $\pm$ 5.11 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}	147.9 $\pm$ 9.1 ^{**Δ}	126.4 $\pm$ 8.5 ^{**Δ}	64.81 $\pm$ 3.55 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}
	第 8 天	5	41.83 $\pm$ 4.81 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}	102.6 $\pm$ 7.6 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}	98.1 $\pm$ 6.5 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}	58.54 $\pm$ 4.29 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}
	第 15 天	5	36.58 $\pm$ 4.11 ^{Δ}	91.9 $\pm$ 6.7 ^{Δ}	79.4 $\pm$ 6.9 ^{**$\Delta$$\Delta$}	47.17 $\pm$ 4.36 ^{**$\Delta$$\Delta$$\Delta$}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素 6; IL-10, 白细胞介素 10; 与假手术组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与中药组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与干细胞组比较, # $P < 0.05$

表 3 各组大鼠不同时间脑组织细胞凋亡 TUNEL 染色吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 4 天	第 8 天	第 15 天
假手术组	5	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.02
模型组	5	0.31 ± 0.04**	0.26 ± 0.01**	0.24 ± 0.02**
中药组	5	0.31 ± 0.02**	0.24 ± 0.05**	0.22 ± 0.01**△▲
干细胞组	5	0.29 ± 0.04**	0.23 ± 0.02**△	0.22 ± 0.02**△▲
联合组	5	0.30 ± 0.02**	0.23 ± 0.04**△	0.19 ± 0.05**△

注:与假手术组同时时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较, △ $P < 0.01$; 与联合组同时时间比较, ▲ $P < 0.05$

3 讨论

MSCs 是一类具有自我更新、多向分化潜能的干细胞, 现已从骨髓、外周血、脐带血、脂肪等大量组织中成功提取, 被广泛地应用于基因和细胞治疗^[1]。研究显示, 静脉或颅内注射移植 hUC-MSCs 都可以有效改善脑缺血再灌注动物模型的肢体运动功能, 其机制可能与干细胞定向归巢、分化促进神经新生, 抑制细胞凋亡, 促进脑内神经营养因子合成分泌相关^[7-8]。临床研究发现, 干细胞移植可以明显促进患者的肌肉收缩力并改善其各项神经功能评分, 且未出现明显的免疫排斥反应等不良事件^[9]。

中医理论认为, “脑为髓之海”, 肾藏精、精生髓, 因此, 脑髓之病本在于肾。中老年人气血渐损, 精血渐亏, 肾精不充, 脑髓失养, 血脉不畅, 则易化生痰瘀阻滞脑络发为中风。因此, 肾虚血瘀也是缺血性中风的重要病机, 治疗应当在化痰通络时兼以培补肾元, 肾精充盈则气血自旺, 痰瘀自去, 窍络自通。肾脑复元汤全方由 11 味药物组成, 黄芪、熟地黄补脾益肾、填精生髓为君药; 山药、山萸肉健脾补肾、养阴生精为臣药; 牡丹皮、赤芍、红景天、当归尾乃活血通经之药, 化痰时兼顾滋阴养血而无伤正之弊为佐药; 地龙以其蠕行通幽之性引药直入瘀滞之络脉, 通塞开窍为使药。全方共奏填精益肾、补髓生血、化痰通络之效。

中风的病理机制研究表明, 炎症反应是脑缺血损伤的重要机制, 而 $\text{TNF-}\alpha$ 由巨噬细胞合成, 影响炎症效应和免疫应答, 是导致脑缺血再灌注后炎症损伤的重要细胞因子^[10]。 $\text{TNF-}\alpha$ 可介导中性粒细胞及淋巴细胞的激活、黏附因子的表达和 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 等其他炎症介质的合成, 进一步加重局部组织损伤^[11]。 IL-1 是一种常见的致炎因子, 其中 $\text{IL-1}\beta$ 可诱导并激活淋巴细胞, 促进炎性介质和氧自由基的释放, 引起脑水肿, 并产生一系列级联放大的炎

症反应, 实验中注射 $\text{IL-1}\beta$ 可加重脑缺血损伤, 而注射 $\text{IL-1}\beta$ 抗体可以减少损伤^[12]。 IL-6 是一种免疫调节炎症因子, 具有促炎和抗炎的双重效应, 在炎症应激反应中, IL-6 可以诱导白细胞的黏附作用, 并能激活补体, 造成微循环堵塞, 引起组织细胞损伤。 IL-10 是一种强有力的抗炎因子, 可抑制单核巨噬细胞和 Th1 细胞活化, 下调 IL-1 及 $\text{TNF-}\alpha$ 表达, 从而产生对炎症因子合成的负反馈调节作用^[13]。

本实验结果显示, 造模后各组大鼠均有明显的细胞凋亡表现, 炎症因子表达也有不同程度升高。与模型组相比, 中药组与干细胞组均可明显改善脑缺血后大鼠神经功能, 减少细胞凋亡, 降低 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 的表达, 促进 IL-10 的表达, 但在缺血早期 (第 4 天) 干细胞组的疗效明显优于中药组, 在第 8、15 天, 二者疗效相当, 说明肾脑复元汤的治疗效应主要发生在恢复期, 这与前期观察^[3] 相符合。同时, 联合组具有最佳疗效, 说明肾脑复元汤与 hUC-MSCs 移植联用后可明显提高治疗效应。据此推论, 肾脑复元汤联合 hUC-MSCs 移植治疗缺血性中风其机制可能与调节脑缺血再灌注后免疫炎症反应有关。

参考文献

- [1] LI Y, HU G, CHENG Q. Implantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells for ischemic stroke: perspectives and challenges [J]. Front Med, 2015, 9(1): 20-29.
- [2] 陈薇, 胡玉英. 中医药治疗缺血性中风研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(4): 474-475.
- [3] 乐金海. 肾脑复元汤治疗缺血性中风恢复期肾虚血瘀证的临床疗效观察 [J]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [4] 胡国恒, 李映辰, 程齐来, 等. 肾脑复元汤对脑缺血大鼠 BDNF 及 bFGF 表达的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(10): 2274-2278.
- [5] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] KUPTSOVA K, KVIST E, NITZSCHE F, et al. Combined enriched environment-atipamezole treatment transiently improves sensory functions in stroke rats independent from neurogenesis and angiogenesis [J]. Rom J Morphol Embryol, 2015, 56(1): 41-47.
- [7] LIN YC, KO TL, SHIH YH, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke [J]. Stroke, 2011, 42(7): 2045-2053.
- [8] LIAO W, XIE J, ZHONG J, et al. Therapeutic effect of

human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke [J]. Transplantation, 2009, 87(3): 350-359.

[J] JIANG Y, ZHU W, ZHU J, et al. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery [J]. Cell Transplant, 2013, 22(12): 2291-2298.

[10] 刘坤, 姚阳, 商丽宏, 等. 促红细胞生成素对大鼠脑缺血再灌注后 claudin-5 和 TNF- α 表达的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(6): 484-486.

[11] AMANTEA D, TASSORELLI C, PETRELLI F, et al. Understanding the multifaceted role of inflammatory mediators in ischemic stroke [J]. Curr Med Chem, 2014, 21(18): 2098-2117.

[12] KAWABORI M, YENARI MA. Inflammatory responses in brain ischemia [J]. Curr Med Chem, 2015, 22(10): 1258-1277.

[13] YANG Z, ZHONG L, ZHONG S, et al. Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model [J]. Exp Mol Pathol, 2015, 98(2): 219-224.

Effect of Shennao Fuyuan Decoction (肾脑复元汤) Combined with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Inflammatory Factors in Rat Model of Middle Cerebral Artery Ischemia-Reperfusion

LI Yingchen¹, ZHOU Jianda¹, HU Guoheng²

(1. The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410013; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Shennao Fuyuan Decoction* (肾脑复元汤, SFD) combined with human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSC) transplantation in treating ischemic stroke.

Methods Seventy-five rats were randomized into a sham-operation group, a model group, a Chinese herbs group, a stem cell group and a combination group, with 15 rats in each group. The model of middle cerebral artery ischemia-reperfusion was built in each group except for the sham-operation group. Since the first day after modeling, the Chinese herbs group and the combination group were given 11.6 g/kg of SFD by gavage, while the other 3 groups were given 10 ml/kg of distilled water by gavage, once a day for 15 days. The stem cell group and the combination group were gently injected 1×10^6 hUC-MSCs through caudal vein on the first day after modeling. The neural function was scored 24 h before operation, and 2 h, the 4th day, 8th day and 15th day after operation. The apoptotic cells were marked by TUNEL staining on the 4th, 8th and 15th day after modeling respectively, and the serum expressions of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1β (IL- 1β), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 10 (IL-10) were detected. **Results** Compared with those in the model group, the neural function scores lower, the apoptotic cell number declined, the expressions of IL- 1β and IL-6 dropped, and IL-10 expression increased in the Chinese herbs group on the 8th and 15th day, as well as in the stem cell group and the combination group on the 4th, 8th and 15th day after modeling ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with that in the Chinese herbs group, the expression of TNF- α lowered in the combination group on the 4th and 8th day ($P < 0.05$); compared with those in the Chinese herbs group and the stem cell group, the expressions of IL- 1β and IL-6 decreased on the 8th day, and the neural score lowered, while the apoptotic cell number decreased, and the expression of IL-10 raised on the 8th and 15th day in the combination group ($P < 0.05$). **Conclusion** FD combined with hUC-MSC transplantation could promote the neural function recovery in rats with the middle cerebral artery ischemia-reperfusion, and its mechanism may have some relations with regulating the inflammatory reactions.

Keywords ischemic stroke; cerebral ischemia reperfusion; human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSC); *Shennao Fuyuan Decoction* (肾脑复元汤); inflammatory factor

(收稿日期: 2017-01-05; 修回日期: 2017-03-12)

编辑: 邓 媛