

补阳还五汤联合间充质干细胞移植对脑缺血再灌注损伤大鼠 bFGF mRNA 表达的影响

张运克^{1*} 杨广华²

(1. 河南中医学院第一附属医院, 河南省郑州市人民路 19 号, 450000; 2. 河南中医学院)

基金项目: 河南省高校杰出科研人才创新工程项目(2007KYCX007); 河南省杰出青年计划(08100510015)

* 通讯作者: henanzky@yahoo.com.cn, (0371) 66281963

[摘要] **目的** 探讨补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞(MSCs)移植对脑缺血损伤的神经保护机制。**方法** 将48只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、MSCs移植组(MSCs组)、补阳还五汤联合MSCs移植组(联合组),每组12只。建立局灶性脑缺血再灌注模型, MSCs组、联合组从尾静脉注入MSCs,联合组并给予补阳还五汤,给药10天后检测碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)基因表达情况。**结果** MSCs组与联合组均能上调大鼠脑组织bFGF mRNA表达水平,与模型组和假手术组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),联合组表达明显高于MSCs组($P < 0.05$)。**结论** 补阳还五汤联合MSCs移植能通过上调脑组织bFGF mRNA表达水平,促进内源性神经营养因子bFGF基因表达而起对脑缺血再灌注损伤起保护作用。

[关键词] 补阳还五汤;间充质干细胞;脑缺血再灌注损伤;成纤维细胞生长因子

Effect of Buyang Huanwu Decoction Combined with Mesenchymal Stem Cells Transplantation on the Expression of bFGF mRNA in Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Rats

ZHANG Yunke¹, YANG Guanghua²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000; 2. Henan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the nerve protecting function of Buyang Huanwu Decoction (Decoction of invigorating yang for recuperation) combined with bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation for the cerebral ischemia injury. **Methods** Forty-eight SD rats were randomized into sham operation group, model group, MSCs transplantation group (MSCs group), and Buyang Huanwu Decoction combined with MSCs transplantation group (combined group) with 12 rats in each group. The models of focal cerebral ischemia-reperfusion were established. The MSCs group and combined group were treated with the tail intravenous injection of MSCs and the latter was also given Buyang Huanwu Decoction. After 10 days of treatment, the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) was observed. **Results** Both the MSCs group and the combined group could up-regulate the expression of bFGF mRNA of the brain tissue of rats. Compared with the model group and the sham operation group, there was significant difference ($P < 0.05$). And the combined group was the strongest one in effect ($P < 0.05$). **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction combined with MSCs transplantation protects the brain injured by cerebral ischemia-reperfusion through up-regulating the expression of bFGF mRNA for promoting the expression of endogenous neurotrophic factor bFGF.

Key Words Buyang Huanwu Decoction (Decoction invigorating yang for recuperation); mesenchymal stem cells (MSCs); cerebral ischemia-reperfusion injury; basic fibroblast growth factor (bFGF)

脑缺血后神经营养因子基因表达的改变在抵御缺血性神经元损伤、维持神经元正常机能和脑缺血损伤修复过程中具有重要作用^[1],其中碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)能促进神经元存活及突起生长,对维护中枢神经系统正常功能起重要作用,被认为是一种最有效的营养因子。因此本研究探讨补阳还五汤联合间充质干细胞(MSCs)移植对脑缺血再灌注损伤大鼠模型bFGF mRNA表达水平的影响。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

清洁级雄性SD大鼠48只,月龄3个月,体重为280~320g。购自河南省实验动物中心,动物许可证号:SYXK(豫)2005-0012。按随机数字表法将SD大鼠分为:假手术组、模型组、MSCs移植组(MSCs组)、补阳还五汤联合MSCs移植组(联合组),每组12只。

1.2 仪器与试剂

梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司生产);柯达 GelLogic¹⁰⁰ 全自动凝胶成像系统(晶美生物技术公司);低熔点琼脂糖(西班牙 Biowest 公司);图像分析软件(Image-Pro Plus^{5.0};Media Cybernetics 美国);胎牛血清(杭州四季青公司,批号:sh30070.03);低糖 DMEM 培养液(L-DMEM, Gibco, 美国);Trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司);三氯甲烷(北京化工厂,批号:20090101);Perfect ShotTM Taq 试剂盒(大连宝生物工程有限公司, code:D308 A);DNA Synthesis Report(北京赛百盛基因技术有限公司, code:152 OD);DNA marker DL2000(天根生化科技北京有限公司,目录号:MD114), 110bp DNA Ladder(北京赛百盛生物工程有限公司)。

1.3 药物制备

选用当归 60g、桃仁 30g、川芎 30g 加水 720ml, 提取挥发油, 备用。药渣及提取液加入黄芪 120g、赤芍 60g、地龙 30g、红花 30g, 再加入 920ml 水, 煎煮 1h, 滤过, 药渣再加入 8640ml 水, 煎煮 1h, 滤过, 合并两次煎液, 浓缩至 600ml, 加入挥发油及吐温-80 3ml, 混匀, 装瓶进行高压高温消毒。相当于生药 2.4g/ml。由河南中医学院第一附属医院制剂科制备。

2 方法

2.1 引物设计及合成

引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。 β actin 预期扩增片段约 542bp。引物序列为:上游引物 F1: 5'-ATGGGTCAGAAGGACTCC-TATG-3';下游引物 R1: 5'-ATCTCCTGCTCGAAGTCTAGAG-3', bFGF 预期扩增片段约 110bp。引物序列为:上游引物 F2: 5'-CCCTATCCCTTCACAGCC-3';下游引物 R1: 5'-CACCTTCCGACCAGCAAC-3'。

2.2 动物模型的建立

参照改良的 Zea-Longa 法^[2]建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型。10%水合氯醛(35mg/100g)腹腔麻醉, 常规消毒, 颈正中切口分离右侧颈总动脉(CCA), 颈外动脉(ECA)与颈内动脉(ICA), 在近 CCA 分叉处约 5~8mm 处结扎 ECA, 在解剖显微镜下分离结扎 ICA 的颅外分支翼腭动脉, 用血管夹阻断 CCA 与 ICA 的血流, 在 ECA 近分叉处留置一打好结的丝线, 勿收紧线结, 在此线上端剪一小口, 插入栓线头端, 收紧线结, 松去血管夹, 顺 ECA 经 ICA 将栓线送入颅内, 插入深度为(20±0.5)mm。

2.3 MSCs 的制备

参照文献[3]采用密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)并进行培养, 5天后更换培养液, 以后每 3 天全量换液, 同时观察记录倒置显微镜下细胞的形态变化。待贴壁细胞完全融合后, 0.25%胰蛋白酶消化传代, 经不断传代使 MSCs 得到扩增和纯化。

2.4 MSCs 移植及给药方法

MSCs 组和联合组在大鼠局灶性脑缺血 2h 再灌注 1 天后, 经颈动脉注入 1×10^6 MSCs 悬液, 假手术组、模型组注入生理盐水。假手术组、模型组及 MSCs 组分别灌胃生理盐水(15ml/kg), 联合组同剂量灌胃补阳还五汤。均于造模前 3 天开始给药, 每日 1 次, 连用 10 天。然后断头取出全脑组织, 分装于 Eppendorf 管中, 置于 -80℃ 液氮罐中冻存。

2.5 总 RNA 的提取

称取脑组织 200g, 加入 1000 μ l 的 Trizol 裂解液, 振荡混匀, 室温放置 10min 后加入氯仿 200 μ l, 放置 3min, 低温离心机 12000r/min 离心 15min, 取上清液, 加入等体积的异丙醇, 冰浴放置 10min, 12000r/min 离心 15min, 弃上清, 75%冰乙醇洗涤两次, 风干。加 20 μ l 焦碳酸二乙脂(DEPC)灭菌水溶解, 即得总 RNA。取 5 μ l RNA 留作电泳鉴定, 其余 -80℃ 冻存备用。

2.6 cDNA 合成

冰上配制反应混合物:Rnase Free ddH₂O 6 μ l; Oligo dT Primer 1 μ l; Dntp Mixture 1 μ l; 模板 RNA 溶液 2 μ l, 振荡混匀后 65℃ 水浴 5min。继续加入:5× Prime ScriptTM Buffer 4 μ l; Rnase Inhibitor 0.5 μ l; Prime ScriptTM Rtase 0.7 μ l; Rnase Free ddH₂O 4.8 μ l, 总体积为 20 μ l, 混匀 42℃ 水浴 60min, 再转入 70℃ 水浴 15min 结束反应, 所得产物即为 cDNA。

2.7 RT-PCR 扩增

采用 PerfectShotTM Taq 扩增试剂盒, 体系 25 μ l; PerfectShotTM Taq 12.5 μ l; 上、下游引物各 1 μ l; 模板 cDNA 2 μ l; 灭菌纯水 8.5 μ l。反应程序:94℃ 预变性 3min; 94℃ 变性 30s, 57℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 72℃ 终延伸 5min, 35 个循环; 4℃ 保存。

2.8 结果分析

取 5 μ l PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶图像分析系统对电泳条带进行密度扫描、分析实验结果。用该分析系统扫描并记录靶条带处光密度积分值, 显示出 bFGF 基因的含量, 记录结果。 β actin 作为内参, 软件定量分析两者的比值。

2.9 统计学方法

采用SPSS 13.0 统计分析软件进行数据处理, 计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 模型组大鼠脑组织总RNA 的鉴定

电泳检测结果显示RNA 带型完整, 28S 和 18S 条带清晰、明亮、条带锐利, 并且 28S 的亮度在 18S 条带的两倍以上(图1)。紫外分光光度计检测纯度为 $A_{260}/A_{280} = 1.99$, 可满足 RT-PCR 扩增目的基因的要求。

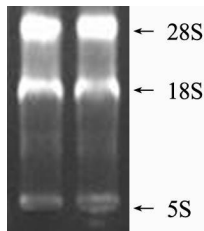


图1 模型组大鼠脑组织总RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

3.2 各组大鼠bFGF mRNA 相对表达水平比较

表1 示, 模型组和假手术组SD 大鼠脑组织仅有bFGF mRNA 轻微表达, 联合组bFGF mRNA 具有较高表达。与假手术组相比, 模型组bFGF mRNA 表达水平有轻微提高, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 联合组、MSCs 组均较模型组假手术组有显著性增高($P < 0.05$)。与MSCs 组相比, 联合组bFGF mRNA 表达水平均有增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠bFGF mRNA 相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	bFGF
假手术组	7	1.04±0.27
模型组	8	1.17±0.34
MSCs 组	7	1.92±0.77 *▲
联合组	8	4.38±2.32 *▲△

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, ▲ $P < 0.05$; 与 MSCs 组比较, △ $P < 0.05$

4 讨论

bFGF 是一种具有较强促增殖作用的多肽生长因子, 在神经元中含量最为丰富^[4]。正常情况下脑组织中的 bFGF 表达很少^[5], 但脑组织缺血损伤后 bFGF 基因表达明显增强。bFGF 基因表达参与脑缺血再灌注损伤神经保护作用, 对神经细胞变性、坏死起重要的调节作用^[6], 对缺血性脑卒中有潜在的治疗作用。

既往研究表明, 联合组及单纯 MSCs 移植组再灌注 24h 通过向神经细胞分化、抑制神经细胞的凋

亡等机理改善神经功能缺损症状^[7-9]。本研究结果显示, 脑缺血再灌注损伤后 bFGF mRNA 有了轻微的表达, MSCs 移植能够升高 bFGF 的表达水平, 而补阳还五汤联合 MSCs 移植治疗能够显著增加 bFGF 的表达水平。从而证明促进内源性 bFGF 基因表达是补阳还五汤联合 MSCs 移植治疗对脑缺血再灌注损伤起保护作用的途径之一, 补阳还五汤和外源性 MSCs 移植治疗脑缺血再灌注损伤具有整体协同作用。

缺血性再灌注脑损伤是一个复杂的病理生理过程, 属于级联事件, bFGF 在保护缺血性脑损伤作用方面具有重要地位, 能够促进神经发生, 减少梗死体积, 降低脑水肿, 促进脑缺血后神经功能恢复。但补阳还五汤联合 MSCs 移植升高脑缺血再灌注损伤模型 bFGF mRNA 的表达, 是否是脑保护启动环节, 及 bFGF mRNA 的表达与神经细胞的分化、细胞凋亡及血管新生之间的因果关系尚需进一步研究。

参考文献

[1]王永炎, 张伯礼. 中医脑病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 664-652.

[2]曹勇军, 程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改进与探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17(2): 198-200.

[3]许予明, 秦洁, 邢莹, 等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(2): 269-271.

[4]李欣欣, 戴德哉. 碱性成纤维细胞因子对脑缺血的保护作用[J]. 药学进展, 2003, 27(1): 22-26.

[5]Liu Y, Lu JB, Ye ZR. Permeability of injured blood brain barrier for exogenous bFGF and protection mechanism of bFGF in rat brain ischemia [J]. Neuropathology, 2006, 26(3): 257-266.

[6]Li Q, Stephenson D. Postischemic administration of basic fibroblast growth factor improves sensorimotor function and reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in the rat [J]. Exp Neurol, 2002, 177(2): 531-537.

[7]张运克. 补阳还五汤及其拆方影响脑缺血再灌注大鼠细胞凋亡与 Bcl-2、Bax 蛋白的表达[J]. 中国临床康复, 2006, 10(43): 196-199.

[8]张运克, 车志英. 益气活血方体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(6): 1171-1175.

[9]张运克, 车志英, 梅雪蕊. 补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞移植对大鼠脑缺血再灌注模型神经细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(8): 1660-1663.

(收稿日期: 2010-06-02; 修回日期: 2010-11-25)

[编辑: 行之]