

补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞移植对脑缺血再灌注大鼠脑组织 NSE 和 GFAP 表达的影响

张运克^{1*} 高峰² 张丹³ 杨广华¹ 刘颖¹ 杨俊红¹

(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. 河南省(郑州大学)医药科学研究院; 3. 开封市中医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072799)

* 通讯作者: henanzky@126.com, (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 组、联合组, 每组 12 只。采用线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 造模后 1 天 MSCs 组、联合组尾静脉注入含 2×10^6 个 MSCs 悬液; 造模前 3 天开始联合组给予补阳还五汤 10ml/kg, 假手术组、模型组、MSCs 组以等体积生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 10 天。采用免疫组织化学法检测脑组织神经元特异性烯醇化酶(NSE)及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。结果 MSCs 组与联合组均可见 NSE、GFAP 阳性细胞表达, NSE 主要表达在神经元细胞胞体, GFAP 主要表达在细胞轴突。与 MSCs 组比较, 联合组 NSE、GFAP 阳性细胞率显著升高($P < 0.05$)。模型组与假手术组未见 NSE、GFAP 阳性细胞表达。结论 补阳还五汤可能通过提高脑组织中 NSE、GFAP 表达, 从而促进移植的 MSCs 向神经样细胞分化, 改善脑缺血损伤。

[关键词] 补阳还五汤; 骨髓间充质干细胞; 脑缺血再灌注; 神经元特异性烯醇化酶; 胶质纤维酸性蛋白

Effects of Buyang Huanwu Decoction Combined With Mesenchymal Stem Cells Transplantation on the Expression of NSE and GFAP in Brain Tissue of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Rats

ZHANG Yunke¹, GAO Feng², ZHANG Dan³, YANG Guanghua¹, LIU Ying¹, YANG Junhong¹

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Henan Province 450000; 2. Institute of Medicine, University of Zhengzhou, Henan Province; 3. TCM Hospital of Kaifeng)

ABSTRACT Objective To research the neuroprotective mechanism of Buyang Huanwu Decoction (Yang-Supplementing Five-Returning Decoction) combined with mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation for cerebral ischemic injury. **Methods** Forty-eight SD rats were randomized into the sham operation group, model group, transplantation group and combination group, with 12 in each. The focal cerebral ischemia-reperfusion models were established with Zea Longa's suture-occluded method. The transplantation group and combination group were injected with 2×10^6 MSCs suspension. The combination group was gavaged with 10ml/kg Buyang Huanwu Decoction 3 days before the operation. The sham operation group, model group and transplantation group were gavaged with equal volume of normal saline once daily for 10 consecutive days. The expression of neuron-specific enolase (NSE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in brain tissue was detected with immunohistochemical method. **Results** The expression of NSE and GFAP positive cells could be seen in both transplantation group and combination group. NSE was mainly expressed in neuronal cell bodies and GFAP was mainly expressed in the cell axons. Comparing with the transplantation group, the positive cell rates of NSE and GFAP were significantly increased in the combination group ($P < 0.05$). There was no expression of NSE and GFAP positive cells in the model group and sham operation group. **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction can promote the differentiation of transplanted MSCs into neuron-like cells and relieve cerebral ischemic injury, which may be relevant to increasing the expression of NSE and GFAP.

Keywords Buyang Huanwu Decoction; mesenchymal stem cell; cerebral ischemia-reperfusion; neuron-specific enolase; glial fibrillary acidic protein

缺血性脑血管病是当今社会威胁人类健康的主要疾病, 干细胞移植可能成为最有希望的新兴治疗手段^[1]。骨髓间充质干细胞(MSCs)具有跨胚层分化潜能, 可在适宜条件下分化为神经细胞^[2-3]。前期研究结果显示, 补阳还五汤联合 MSCs 移植可明

显减少局灶性脑缺血再灌注(MACO)大鼠脑梗死体积, 改善脑缺血后神经行为症状^[4]。本研究通过观察补阳还五汤联合 MSCs 移植对 MACO 大鼠缺血脑组织中神经元特异性烯醇化酶(NSE)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达, 从补阳还五汤诱导移

植的 MSCs 向神经细胞分化角度探讨其神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,体重为 280~320 g,购自河南省实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(豫)2005-0001。

1.2 主要试剂与仪器

SP 免疫组化试剂盒购自福建迈新公司(批号:70119999);兔抗大鼠 NSE(批号:BA0535)、兔抗大鼠 GFAP(批号:SA1025),购自武汉博士德生物工程有限公司。MCO175 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司),IX-71 倒置显微镜(日本 Olympus),RM2235 石蜡切片机(德国 Leica),CX41 显微摄像系统(日本 Olympus)。

1.3 药物

补阳还五汤,处方:当归 60 g,桃仁 30 g,川芎 30 g,加水 720 ml 提取挥发油备用;药渣及提取液加入黄芪 1200 g,赤芍 60 g,地龙 30 g,煎 2 次,合并煎液缩至 600 ml,加入挥发油及 3 ml 吐温 80,混匀。由河南中医学院第一附属医院制剂科制备。

1.4 MSCs 制备

参照文献[5]进行。采用密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞,台盼蓝染色,光学显微镜下计数活细胞 $\geq 95\%$,调整细胞浓度至 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$,接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,置于体积分数为 5%CO₂、饱和湿度的 37℃ 孵箱培养,5 天后换液,弃去未贴壁细胞,以后每 3 天全量换液,镜下观察细胞的形态,待贴壁细胞完全融合后,0.25%(质量体积比)胰酶消化传代,每 3 天全量换液,多次传代使 MSCs 扩增和纯化。

1.5 动物分组与造模

按随机数字表法将 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、MSCs 组、联合组,每组各 12 只。除假手术组外其余各组参照文献[6]方法建立大鼠 MCAO 再灌注模型。待大鼠清醒后进行神经功能评分^[7]:0 分:无神经缺损症状;1 分:不能伸展对侧前爪;2 分:行走时向偏瘫侧转圈;3 分:向偏瘫侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。1~3 分症状的动物代表造模成功。

1.6 给药方法

术前 3 天,联合组大鼠给予 10 ml/kg(相当于成人剂量的 10 倍,成人按 60 kg 计)补阳还五汤灌胃,

其他各组以同等体积生理盐水灌胃,每日 1 次。在造模后 1 天,MSCs 组、联合组大鼠尾静脉注射含 2×10^6 个的 MSCs 悬液,假手术组、模型组注射等体积生理盐水;联合组继续给予补阳还五汤 10 ml/kg 灌胃,其他各组给予同等体积生理盐水,每天 1 次,7 天后取材。

1.7 NSE 和 GFAP 免疫组织化学检测

大鼠麻醉后,在 10~20 min 内经左心室灌注 37℃ 生理盐水 200 ml 后,灌注 4℃ 多聚甲醛固定液 250 ml,40 min 内灌注完,取脑。切取视神经末端以下 2 mm 脑组织,固定,石蜡包埋,沿视神经末端侧作 5 μm 连续切片。采用免疫组织化学染色法检测 NSE(神经元标记物)及 GFAP(星型胶质细胞标记物)的表达。兔抗大鼠 NSE 一抗 1:100 稀释,兔抗大鼠 GFAP 一抗 1:100 稀释,空白对照以 PBS 缓冲液代替一抗。显微镜下随机选择 5 个非重叠视野($\times 200$),观察 NSE 和 GFAP 表达并计算阳性细胞数占总细胞数百分比。

1.8 统计学方法

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

2 结果

免疫组化染色显示,联合组、MSCs 组可见 NSE 阳性细胞,NSE 阳性表达分布在神经元样细胞胞体,多数呈棕黄或深棕色,少量呈淡黄色;联合组、MSCs 可见 GFAP 阳性细胞,GFAP 阳性表达分布在细胞轴突和胞体。假手术组和模型组未见 NSE 和 GFAP 阳性细胞表达。表 1 示,MSCs 组与联合组间 NSE、GFAP 阳性细胞率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 MSCs 组和联合组 NSE 和 GFAP 阳性细胞率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NSE 阳性率	GFAP 阳性率
MSCs 组	12	4.55 $\pm$ 1.80	3.68 $\pm$ 0.88
联合组	12	5.47 $\pm$ 1.24*	4.11 $\pm$ 0.62*

注:与 MSCs 组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

脑缺血引起缺血区神经元不可逆死亡,梗死区周边的成熟神经元不能再生来弥补死亡的神经元,导致脑缺血预后不佳。MSCs 在某些内在机制和微循环影响下具有类似胚胎干细胞的高度分化能力,因而利用 MSCs 移植替代死亡的神经元成为脑缺血

治疗领域的研究热点。

研究发现, MSCs 移植于受损的动物脑组织中, 可以明显改善或加快神经损伤动物的神经功能恢复^[5]。张向群等经尾静脉移植 MSCs 治疗局灶性大鼠脑缺血损伤, 3 天、7 天和 14 天神经功能评分明显升高, 网屏实验、平衡木实验及抓握牵引实验均有明显改善^[8]。本研究结果显示, 脑缺血坏死区 NSE 阳性反应主要集中在神经元样细胞胞体, GFAP 阳性反应则主要发生在细胞的轴突和细胞胞体, 联合组两种阳性细胞比例均增加明显。说明经尾静脉注射的 MSCs 能够定向趋化至脑缺血坏死区, 在体内向神经元样细胞和星形胶质细胞分化, 而在补阳还五汤的诱导下, 分化过程受到明显促进作用, 补阳还五汤联合 MSCs 移植疗法在缺血性脑损伤治疗中显示了巨大的潜在价值。

补阳还五汤重用黄芪为君, 大补脾胃元气, 以补气行血、通络祛瘀; 配伍养血活血之当归为臣; 佐以活血祛瘀、通经活络之赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙; 全方共奏补气活血通络之功。补阳还五汤联合 MSCs 移植明显改善 MACO 大鼠神经功能评分的机制十分繁杂, 既有分化为神经样细胞产生的替代作用, 也有 MSCs 分泌细胞因子等的调节作用, 还有因血管新生改善供氧条件等影响^[9]。本研究根据 NSE 及 GFAP 的阳性表达率情况, 初步探讨了补阳还五汤在体内促进 MSCs 向神经样细胞分化可能产生的替代作用, 而这些神经样细胞能否真正部分替代坏死神经细胞功能还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke[J]. Cur opin neurol, 2005, 18(1): 59-64.
- [2] Heo JS, Choi SM, Kim HO, et al. Neural transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on hydrophobic polymer-modified surface and therapeutic effects in an animal model of ischemic stroke[J]. Neuroscience, 2013, 238: 305-318.
- [3] Manley NC, Steinberg GK. Tracking stem cells for cellular therapy in stroke[J]. Curre Pharm Des, 2012, 18(25): 3685-3693.
- [4] 张运克, 杨广华. 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[J]. 中医杂志, 2011, 52(7): 589-591.
- [5] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2011, 32(4): 1005-1011.
- [6] 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.
- [7] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in the rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] 张向群, 王新平, 景文莉. 尾静脉移植骨髓间充质干细胞治疗脑缺血损伤大鼠的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 27(9): 796-800.
- [9] Bae KS, Park JB, Kim HS, et al. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(3): 401-412.

(收稿日期: 2013-05-10; 修回日期: 2013-08-05)

[编辑: 洪 涛]

(上接第 2014 页)

- [7] 朱镛连. 神经康复学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 183-184.
- [8] 国家中医药管理局脑病急症科研组. 中风病辨证诊断标准(试行)[J]. 北京中医药大学学报, 1991, 17(3): 64-66.
- [9] Fugl-Meyer AR, Jaasko L, Leyman I, et al. The post-stroke hemiplegic patient. 1. a method for evaluation of physical performance[J]. Scand J Rehabil Med, 1975, 7(1): 13-31.
- [10] 王洪忠. 实用中西医结合偏瘫康复学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997: 29-30.
- [11] 王茂斌. 偏瘫的现代评价与治疗[M]. 北京: 华夏出版社, 1990: 226-231.
- [12] “九五”攻关课题组. 急性脑卒中早期康复的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2001, 16(5): 266-272.
- [13] 叶绍伟, 徐志坚, 黄德弘, 等. 益肾解痉汤加激光治疗脑

梗塞偏瘫的临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(5): 53.

- [14] 许幸仪, 黄坚红, 梁洁, 等. 通络四号治疗脑梗死急性期 35 例临床观察[J]. 甘肃中医, 2007, 20(7): 31-32.
- [15] 许幸仪. 96 例急性中风患者的舌象观察[J]. 吉林中医药, 2004, 24(7): 8.
- [16] 许幸仪, 王春雷. 通络Ⅳ号中药复方对脑缺血模型大鼠脑梗死灶体积的影响[J]. 陕西中医, 2008, 29(2): 237-238.
- [17] 许幸仪, 王春雷. 通络Ⅳ号对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 云南中医学院学报, 2007, 30(4): 38-40.
- [18] 许幸仪, 黄坚红, 陈秀慧. 通络Ⅳ号中药复方对脑缺血再灌注动物神经元保护作用的实验研究[J]. 中国实用医药, 2007, 2(22): 33-34.

(收稿日期: 2013-06-21; 修回日期: 2013-07-10)

[编辑: 王利芬]