

◆方药研究◆

清热化痰方联合 HP-BMSCs 移植对脑缺血损伤大鼠 CD31 表达的影响

秦红玲¹, 来要水², 祝美珍¹, 胡玉英¹, 胡跃强¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 560023; 2. 中国人民解放军第 309 医院, 北京 100000

[摘要] 目的: 观察清热化痰方联合缺氧预处理 (HP) 骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 移植对脑缺血损伤大鼠血管新生标志物 CD31 表达变化及神经功能的影响。方法: 将 120 只大鼠随机分为 6 组: 假手术组 (SO 组)、模型组 (MCAO 组)、BMSCs 移植对照组 (BMSCs 组)、HP-BMSCs 移植组 (HP-BMSCs 组)、BMSCs 移植联合清热化痰方组 (中药对照组) 以及 HP-BMSCs 移植联合清热化痰方组 (中药干预组), 各组根据取材时间点又分为 7 天、14 天两个亚组, 每个亚组 10 只大鼠。线栓法建立大鼠大脑中动脉梗死模型, 根据分组情况给予清热化痰颗粒灌胃及经尾静脉移植 BMSCs 或 HP-BMSCs, 参照 mNSS 评分法进行神经功能评分, 采用免疫组化染色法检测血小板-内皮细胞黏附分子 (CD31) 及 Brdu 标记的 BMSCs 细胞。结果: 与 MCAO 组比较, 中药对照组、中药干预组、HP-BMSCs 组、BMSCs 组神经功能评分显著减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 SO 组比较, 其它各组 CD31 表达均显著上调, 中药干预组上调的最为明显, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 HP-BMSCs 组比较, BMSCs 组神经功能评分增加, CD31 表达下降, Brdu 标记的阳性细胞数较低; 中药干预组神经功能评分显著减少, CD31 表达明显上调, Brdu 标记的阳性细胞数显著增多, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与中药对照组比较, 中药干预组神经功能评分明显减少, CD31 表达量显著增加, Brdu 标记的阳性细胞数显著增多, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 清热化痰方联合 HP-BMSCs 移植可改善脑缺血损伤 SD 大鼠的神经功能, 可能和其促进大鼠脑缺血区血管新生标志物 CD31 的表达相关。

[关键词] 清热化痰方; 缺氧预处理 (HP); 骨髓间充质干细胞 (BMSCs); 脑缺血损伤; 血小板-内皮细胞黏附分子 (CD31); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 01-0001-04
DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.01.001

Effect of Qingre Huayu Prescription Combined with HP-BMSCs Transplantation on Expression of CD31 of Rats with Cerebral Ischemic Injury

QIN Hongling, LAI Yaoshui, ZHU Meizhen, HU Yuying, HU Yueqiang

Abstract: Objective: To observe the effect of Qingre Huayu prescription combined with hypoxic preconditioning (HP) bone mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on expression of angiogenesis marker CD31 and neurological function of rats with cerebral ischemic injury. Methods: Divided 120 rats into 6 groups randomly: the sham operation group (SO group), the model group (MCAO group), the BMSCs transplantation control group (BMSCs group), the HP-BMSCs transplantation group (HP-BMSCs group), the BMSCs transplantation combined with Qingre Huayu prescription group (Chinese medicine control group) and the HP-BMSCs transplantation combined with Qingre Huayu prescription group (Chinese medicine intervention group). Each group was divided into 7-day and 14-day two subgroups according to the sampling time, 10 rats in each subgroup. The middle cerebral artery occlusion rat model was established by the method of suture-occluded method. Qingre Huayu particles were administrated to different groups by gavage and BMSCs or HP-BMSCs was transplanted by tail vein. Scored the neurological function referring to modify Neurological severity scores (mNSS) scoring method. Determined platelet

[收稿日期] 2016-07-18
[基金项目] 广西高等学校优秀中青年骨干教师培养工程资助成果 (JS13069); 广西医疗卫生重点课题 (2012046)
[作者简介] 秦红玲 (1983-), 女, 主治医师, 研究方向: 脑血管疾病的中西医结合治疗。
[通讯作者] 胡跃强, E-mail: 28269060@qq.com.

endothelial cell adhesion molecule (CD31) and BMSCs cells marked with Brdu by immunohistochemistry staining method. **Results** : Scores of mNSS of Chinese medicine control group , Chinese medicine intervention group , BMSCs group and HP- BMSCs group were declined obviously , comparing with that of MCAO group , differences being significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with SO group , other groups' expression of CD31 were all increased significantly , and the most obvious increase was in Chinese medicine intervention group , showing significant differences ($P < 0.01$). In comparison of HP- BMSCs group , mNSS of BMSCs group was raised , while expression of CD31 and the amount of positive cells marked with Bru were decreased ; mNSS of of Chinese medicine intervention group was declined obviously , expression of CD31 was increased significantly and the amount of positive cells marked with Brdu was increased obviously , differences being significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In Chinese medicine intervention group , mNSS was declined obviously , expression of CD31 was increased significantly and the amount of positive cells marked with Brdu was increased obviously when comparing with those in Chinese medicine control group , differences being significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** : Qingre Huayu prescription combined with HP- BMSCs can improve neurological function , which is possibly related to its effect of promoting expression of angiogenesis marker CD31 in cerebral ischemic injured area in rats.

Keywords : Qingre Huayu prescription ; Hypoxic preconditioning ; Bone mesenchymal stem cells ; Cerebral ischemic injury ; Platelet endothelial cell adhesion molecule ; Animal experiment ; Rats

近年来研究显示,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是脑缺血损伤后神经细胞再生的理想种子来源,但是其移植后在宿主内的存活率不高,缺氧预处理(hypoxic preconditioning, HP)是通过非致命性的低氧刺激激活内源性的保护反应,从而提高细胞的抗凋亡能力^[1~2]。脑梗死病机复杂,清热化痰方是以“浊毒”和“瘀血”为病理基础研制出来的具有解毒降浊、活血化瘀功效的复方中药,前期完成的动物实验和临床观察表明,该方治疗脑梗死的效果显著,特别是能促进体内外神经干细胞的增殖,但其作用机制还有待于进一步阐明^[3~6]。本研究旨在从血管新生的角度观察该方联合缺氧预处理后骨髓间充质干细胞(HP- BMSCs)对脑缺血损伤大鼠脑保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和药物 健康雄性 SD 大鼠 121 只(SPF 级),其中 1 只用于 BMSCs 细胞培养,鼠龄 2.0~2.2 月,体质量 (250 ± 50)g,购于广西医科大学动物实验中心,合格证号: SCXK2009- 0002。动物实验通过广西中医药大学动物伦理委员会的审批,严格按照动物伦理委员会的各项要求执行。清热化痰方:水牛角 30 g,丹参、赤芍各 15 g,地龙、石菖蒲、川芎、郁金、天竺黄各 10 g,酒大黄 6 g,单味中药浓缩颗粒剂,由江苏省江阴市江阴天江药业有限公司制备。

1.2 BMSCs 细胞的培养、鉴定及移植前的准备工作 无菌条件下取出 SD 大鼠股骨、胫骨,用 D- MEM/F- 12 培养液 10 mL 反复冲洗骨髓,收集细胞悬液后置于 5% 的 CO₂ 培养箱内,3 天后半量换液,5 天后全量换液,弃去未贴壁的细胞后继续培养,倒置显微镜下观察细胞形态,待细胞基本长满瓶底时(>80%)加入 0.25% 胰酶进行消化,胎牛血清终止消化,结

束原代培养。移植前 48 h 对第 3 代细胞用终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Brdu 溶液进行标记,同时加入配制浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl₂ 进行缺氧预处理,制备 HP- BMSCs 细胞液,并检测标记率。

1.3 动物分组、造模及给药 将 120 只大鼠随机分为 6 组:假手术组(SO 组)、大脑中动脉梗阻组(MCAO 组)、BMSCs 移植对照组(BMSCs 组)、HP- BMSCs 移植组(HP- BMSCs 组)、BMSCs 移植联合清热化痰方组(中药对照组)以及 HP- BMSCs 移植联合清热化痰方组(中药干预组),每组 20 只。除 SO 组外,其余各组参照 Longa's 线栓法^[7]并加以改良建立大脑中动脉梗阻(MCAO)模型,栓塞大鼠左侧大脑中动脉。根据取材时间点各组随机分为 7 天、14 天 2 个亚组,每个亚组 10 只。SO 组线栓只插入颈内动脉 9 mm;MCAO 组造模后灌胃等体积的生理盐水;中药对照组及中药干预组造模前 4 天及造模后,以清热化痰方 14 g/(kg·d)灌胃。BMSCs 组、中药对照组再灌注后 24 h,由尾静脉分别注射 BMSCs 悬浮液 200 μL ,细胞数为 2×10^6 个。HP- BMSCs 组、中药干预组再灌注后 24 h,由尾静脉分别注射 HP- BMSCs 悬浮液 200 μL ,细胞数为 2×10^6 个。

1.4 神经功能学评分 分别于第 7 天、第 14 天参照改良的神经功能缺损(mNSS)^[8]评分法对大鼠进行神经功能缺损评分。

1.5 免疫组化染色法检测 CD31 和 Brdu 标记的阳性细胞 取脑组织,固定、脱水、石蜡包埋,按 5 μm 厚度连续切片,免疫组化采用 SP 法。一抗 CD31、Brdu 多克隆抗体(工作浓度分别为 1:100、1:200)和 SP 试剂盒均购于北京中杉金桥,按试剂盒要求进行操作。CD31 结果:采用 Image- Pro Plus 测定积分光密度值(IOD),取平均值,数值越大表示表达越强。

免疫组化染色法检测曾用 Brdu 标志的 BMSCs 细胞, 每张切片在高倍镜下($\times 400$)观察缺血侧皮质 3 个视野, 计数阳性细胞, 取平均值。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示, 成组设计多样本均数的比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠再灌注后的神经功能缺损评分结果比较 见表1。除 SO 组外, 其余各组大鼠在手术结束麻醉清醒之后采用 mNSS 评分均出现一定程度的神经功能缺损症状。与 MCAO 组比较, 中药对照组、中药干预组、HP- BMSCs 组、BMSCs 组神经功能评分显著减少, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 HP- BMSCs 组比较, BMSCs 组神经功能评分增加, 中药干预组神经功能评分显著减少, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与中药对照组比较, 中药干预组神经功能评分明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠再灌注后的神经功能缺损评分结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	7 d	14 d
SO组	0.00± 0.00	0.00± 0.00
MCAO组	10.30± 1.49	9.30± 1.34
BMSCs 组	8.40± 0.84 ^{①③}	6.60± 0.97 ^{②③}
HP- BMSCs 组	6.70± 1.06 ^①	5.20± 0.63 ^②
中药对照组	5.30± 0.95 ^①	3.60± 0.70 ^①
中药干预组	4.00± 0.67 ^{①③⑤}	2.00± 0.94 ^{②④⑥}

与 MCAO 组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与 HP- BMSCs 组比较, ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$; 与中药对照组比较, ⑤ $P < 0.05$, ⑥ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠再灌注后 CD31 积分光密度值 (IOD) 结果比较 见表2。与 SO 组比较, 其它各组 CD31 表达均显著上调, 中药干预组上调的最为明显, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与 HP- BMSCs 组比较, BMSCs 组 CD31 表达下降, 中药干预组 CD31 表达明显上调, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与中药对照组比较, 中药干预组 CD31 表达显著增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠再灌注后 Brdu 标记的阳性细胞数结果比较 见表3。与 HP- BMSCs 组比较, BMSCs 组的阳性细胞数较低, 中药干预组阳性细胞数显著增多, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与中药对照组比较, 中药干预组阳性细胞数显著增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

实验证明, 经基因修饰的间充质干细胞(MSCs)能够促进脑缺血大鼠神经功能恢复和抗凋亡作用^[9-10]。但是, 用基因修饰 MSC 提高细胞存活的方法也有一些不足之处, 如病毒转染

表2 各组大鼠再灌注后 CD31 积分光密度值 (IOD) 结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	7 d	14 d
SO组	0.16± 0.05	0.17± 0.04
MCAO组	0.23± 0.03 ^①	0.21± 0.02 ^①
BMSCs 组	0.28± 0.03 ^{①②}	0.26± 0.03 ^{①③}
HP- BMSCs 组	0.34± 0.05 ^①	0.32± 0.04 ^①
中药对照组	0.38± 0.07 ^①	0.33± 0.05 ^①
中药干预组	0.48± 0.05 ^{①③④}	0.40± 0.04 ^{①③④}

与 SO 组比较, ① $P < 0.01$; 与 HP- BMSCs 组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$; 与中药对照组比较, ④ $P < 0.01$

表3 各组大鼠再灌注后 Brdu 标记的阳性细胞数结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	7 d	14 d
SO组	0.00± 0.00	0.00± 0.00
MCAO组	0.00± 0.00	0.00± 0.00
BMSCs 组	23.26± 2.54 ^①	23.83± 2.46 ^①
HP- BMSCs 组	26.72± 2.53	29.13± 2.90
中药对照组	29.47± 1.62	33.47± 3.75
中药干预组	32.67± 2.18 ^{②③}	38.36± 1.98 ^{②③}

与 HP- BMSCs 组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与中药对照组比较, ③ $P < 0.05$

时有免疫原性及毒性作用, 转染基因的全面和持续激活可能会增加致肿瘤的风险, 因此也限制了基因修饰方法在临床上的应用^[11]。近年来研究发现, 缺氧预处理(HP)可作为一种提高干细胞移植效果的方法, 且在其他细胞系中已被作为一种保护细胞凋亡和刺激血管新生的有力工具^[12]。Liu 等发现 HP 能促进 BMSCs 高表达缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), 同时 CXCR4 趋化因子受体-4(CXCR4)的表达也增高, 证明经 HP 处理过后的 BMSCs 的迁移力比对照组明显增强^[13]。因此, 为了增加 BMSCs 移植治疗的效果, 很多研究者选择对移植细胞进行 HP 预处理。

目前中药的神经细胞保护剂多集中在益气活血、开窍醒神、化痰通络等方面, 王永炎院士认为: 中风病其病机虽复杂, 但以浊毒、血瘀等表现尤为突出。针对以上病机, 我们提出中风病“清热解毒, 化痰通络”的治疗大法, 并在此基础上组建了清热化痰方。本实验研究发现经 Brdu 标记后的骨髓间充质干细胞, 经尾静脉移植后, 在缺血周边区脑组织中观察到 Brdu 染色阳性细胞, 表明骨髓间充质干细胞在脑内能够成活并向受损部位迁移, 中药干预组的阳性细胞数最多, 因此推断清热化痰方联合缺氧预处理可促进 BMSCs 迁移及存活。通过实验发现移植过 BMSCs 或 HP- BMSCs 各组的 CD31 表达均显著上调, 与 HP- BMSCs 比较, BMSCs 组 CD31 表达下降, 中药干预组 CD31 表达明显上调, 这说明缺氧预处理可以促进

BMSCs 表达 CD31, 其中中药干预组上调的最为明显, 说明清热化痰方与缺氧预处理具有协同作用。同时本研究发现中药干预组组的 Brdu 细胞数最多、CD31 表达最多, 且神经功能评分最低, 这可能与清热化痰方联合 HP- BMSCs 可促进 CD31 表达, 促进血管的新生相关。

[参考文献]

- [1] Xiong Y, Qu C, Mahmood A, et al. Delayed transplantation of human marrow stromal cell-seeded scaffolds increases transcallosal neural fiberlength, angiogenesis, and hippocampal neuronal survival and improves functional outcome after traumatic brain injury in rats[J]. *Brain Res*, 2009, 1263: 183- 191.
- [2] 张婷勇. 骨髓间充质干细胞移植并用单唾液酸神经节苷脂治疗大鼠脑梗死[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(14): 2557- 2561.
- [3] 胡跃强, 胡国恒, 吴云虎, 等. 清热化痰颗粒治疗急性缺血性中风的临床研究[J]. *山东中医药大学学报*, 2004, 28(1): 31- 33.
- [4] 胡跃强, 胡国恒, 吴云虎, 等. 清热化痰颗粒治疗急性脑梗塞临床观察[J]. *辽宁中医杂志*, 2004, 31(2): 120- 121.
- [5] 胡跃强, 唐农, 雷龙鸣, 等. 神经干细胞移植对大鼠脑缺血损伤的影响及清热化痰方的干预[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(10): 1094- 1096.
- [6] 胡跃强, 唐农, 刘泰, 等. 清热化痰方对脑缺血再灌注损伤大鼠神经干细胞增殖的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2011, 9(8): 977- 979.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carkon S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84- 91.
- [8] Zanier ER, Montinaro M, Viganò M, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect mice brain after trauma[J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(11): 2501- 2510.
- [9] Pechan PA, Yohida T, Panahian N, et al. Genetically modified fibroblasts producing NGF protect hippocampal neurons after ischemia in the rat[J]. *Neuroreport*, 1995, 6(4): 669- 672.
- [10] 叶伟标, 邓宇斌, 叶美红, 等. 慢病毒载体介导 HIF- 1 α 基因修饰骨髓间质干细胞促进脑缺血大鼠的神经功能恢复[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(2): 256- 261.
- [11] Meuillet EJ, Mahadevan D, Vankayalapati H, et al. Specific inhibition of the Akt1 pleckstrin homology domain by D- 3- deoxy- phosphatidyl- myo- inositol analogues[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(4): 389- 399.
- [12] Saini U, Gumina RJ, Wolfe B, et al. Preconditioning mesenchymal stem cells with caspase inhibition and hyperoxia prior to hypoxia exposure increases cell proliferation [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(11): 2612- 2623.
- [13] Liu H, Yu XF, Teng J, et al. Effects of hypoxic preconditioning on the migration of bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2012, 92(10): 709- 713.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)