论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1330-04

血管性痴呆大鼠颈内动脉输注脐血单个核细胞与血脑屏障的相关性研究

王昌铭,向 静,王景周,崔 洁,郭咏萍 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要: 目的 探讨脐血单个核细胞(human cord blood mononuclear cells, HCMNCs)颈内动脉输注能否透过血管性痴呆大鼠血脑屏障,以及在脑易损伤部位定居并存活情况。**方法** 大鼠随机分为对照组、模型组和术后6 h、24 h、3 d、7 d、2周5个治疗组,($n=6$)。改良Pulsinellis四血管阻断法建立VD大鼠模型。治疗组颈内动脉输注BrdU标记的HCMNCs(3×10^6/0.5 ml)。采用穿梭箱系统检测大鼠学习记忆能力;免疫组化法检测移植后4周HCMNCs在脑内分布、存活情况。**结果** HCMNCs广泛分布于脑组织,主要集中在海马和大脑皮质区,特别是血管周围;术后6 h组大鼠脑内HCMNCs为(3 598±311),24 h和3 d组最多(4 311±310),(4 426±399),7 d组(3 726±356)、2周组(2 525±298)则呈进行性减少($P<0.05$,$P<0.01$)。注射后2、4周大鼠AAR比率,6 h组均高于模型组($P<0.01$),24 h、3 d组较6 h组显著增高($P<0.05$),7 d组开始下降,显著低于3 d组($P<0.05$);2周组更进一步下降,但仍比模型组显著增高($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 颈内动脉输注HCMNCs可透过VD大鼠血脑屏障向脑易损伤部位迁移聚集并存活,显著改善大鼠学习记忆功能,但其透过血脑屏障具有特定的适宜时间窗。

关键词: 血管性痴呆;脐血;单个核细胞;颈内动脉;血脑屏障

中图法分类号: R322.81;R329.24;R749.13 **文献标识码**: A

Correlative study on intracarotid infusion of human cord blood mononuclear cells and blood brain barrier in vascular dementia rats

WANG Chang-ming, XIANG Jing, WANG Jing-zhou, CUI Jie, GUO Yong-ping (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital; Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the hypothesis that human cord blood mononuclear cells (HCMNCs) could enter the brain of vascular dementia (VD) rats across the blood-brain barrier (BBB) through intracarotid infusion by observing the characteristics of localization and survival of HCMNCs in the sites of damaged brain. **Methods** The rats were randomly divided into a control group ($n=6$), a VD model group ($n=6$) and a treatment group ($n=30$). The VD rat model was established by modified pulsinellis 4VO. The rats in the treatment group were divided into 6 h (6-h), 24 h (24-h), 3 d (3-d), 7 d (7-d) and 2 weeks (2-w) group after 4-Vessel occlusion (4VO) with 6 rats in every group and received intracarotid infusion of 3×10^6/0.5 ml HCMNCs labeled with BrdU *in vitro*. The learning-memory abilities were measured by using computerized shuttle-training case. At 4 weeks after HCMNCs infusion, the characteristics of HCMNCs survival and distribution in brain were studied by immunohistochemical method. **Results** HCMNCs distributed throughout the brain, and mainly localized in hippocampus and cerebral cortex, especially around their blood vessel. HCMNCs increased from (3 598±311) in the 4VO-6-h group to (4 311±311) in 4VO-24-h group and (4 426±399) in 4VO-3-d group, then decreased gradually to (3 726±356) in 4VO-7-d group and (2 525±298) in 4VO-2-w group ($P<0.05$, $P<0.01$). At 2 and 4 weeks after infusion, the ratio of active avoidance reaction (AAR) was higher in 4VO-6-h group than the model group ($P<0.01$), lower than that of 4VO-24-h and 4VO-3-d groups, then decreased in 4VO-7-d group that was significantly lower than that of 4VO-3-d group ($P<0.05$). AAR

基金项目:重庆市科委科研基金攻关项目[7830(2003~2005)]

Supported by the Sci&Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing [7830 (2003-2005)]

作者简介:王昌铭(1972-),男,河南省新乡市人,硕士研究生,主治医师,主要从事血管性痴呆方面的研究,现在解放军150医院神经内科。电话:(023)68719614

通讯作者:王景周,电话:(023)68757363

收稿日期:2006-01-16;修回日期:2006-04-11

ratio of 4VO-2-w group continued to decrease, but still higher than than the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** HCMNCs by intracarotid infusion could enter the cerebra parenchyma across BBB, localized and directed to the damaged sites of brain to survive, and improve learning-memory abilities of VD rats. There is special and suitable therapeutic time window when HCMNCs pass BBB.

Key words: vascular dementia; human cord blood; mononuclear cell; internal carotid artery; blood brain barrier

细胞移植治疗血管性痴呆(vascular dementia, VD)是目前研究的一个热点。近期研究表明,脐血单个核细胞(human cord blood mononuclear cells, HCMNCs)体外适当条件下培养、诱导后可表达 nestin 抗原,并定向分化为神经样细胞[1,2];或移植入大鼠脑内分化成神经元或神经胶质细胞[3,4]。关于细胞移植方式,早期实验多采用脑室或脑实质内直接注射 HCMNCs,这不仅增加了对脑组织的创伤,操作复杂、并发症多,对于弥漫性或多灶性脑组织病变尤不适用。本实验旨在探讨 HCMNCs 颈内动脉输注能否透过 VD 大鼠血脑屏障(blood brain barrier, BBB)在脑实质定居、存活及其分布特点,并了解不同时相点输注对透过率的影响,为临床 HCMNCs 颈内动脉输注治疗 VD 提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物与分组

选取清洁级老龄(18~24 月龄)Wistar 大鼠 42 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)20030003),雌雄不拘,体质量 265~320 g。随机分为对照组、模型组、术后 6 h、24 h、3 d 、7 d、2 周等 5 个治疗组,($n=6$)。

1.2　主要试剂和器材

IMEM 培养基、胎牛血清(美国 GIBCO 公司),磷酸盐缓冲液(北京金衫生物公司),相对密度 1.077 的淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司),明胶(上海化学试剂公司),5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU):美国 Sigma 公司,小鼠抗 BrdU 抗体,免疫组化和 DAB 显色试剂盒:北京中山生物技术有限公司等。

1.3　脐血来源与采集

脐血由第三军医大学大坪医院妇产科提供,健康、足月妊娠产妇胎盘脐带,无菌条件下穿刺脐静脉,用肝素抗凝采血袋收集胎盘脐血。每份脐血 50~100 ml。

1.4　脐血 MNCs 的分离、纯化

将血袋内的抗凝脐血导入 250 ml 无菌生理盐水瓶中,0.01 mol/L 的无菌磷酸盐缓冲液(pH 7.4)等体积稀释,再与 3% 明胶按 1∶1 混匀,静置 40~60 min 沉降红细胞;吸上清 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,制成单细胞悬液,叠加到淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 25 min,吸取中间的白膜层;加入 7~10 倍体积的磷酸盐缓冲液,1 000 r/min 离心 10 min,洗涤 3 次,弃上清,再制成单个核细胞悬液。

1.5　脐血 MNCs BrdU 标记

移植前 72 h,HCMNCs 以 $1.0 \times 10^6/cm^2$ 的密度接种于 IMEM 培养基+20% 胎牛血清培养液中,加入 BrdU 使浓度为 5 μmol/L,培养 72 h 后离心收集 HCMNCs,加入磷酸盐缓冲液重悬细胞(6×10^6/ml),备用。取 BrdU 标记的 HCMNCs,4% 多聚甲醛和 0.3% 戊二醛固定,抗 BrdU 抗体免疫组化染色,光镜下观察、拍照、计数。

1.6　VD 大鼠模型制作

参照文献[5]Pulsinellis 4VO 改良法。

1.7　穿梭箱检测

采用第三军医大学大坪医院野战外科研究所研制的微机控制的穿梭箱主动回避反应系统。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称主动回避反应(active avoidance reaction, AAR),而经电刺激后才能完成穿梭动作称被动回避反应(passive avoidonce reaction, PAR)。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 的穿梭箱训练,以 AAR 比率≥80% 作为入选标准率,<80% 者淘汰;于术前、注射后 2、4 周进行穿梭箱检测。

1.8　HCMNCs 注射方法

治疗组于术后相应时间点颈内动脉输注 BrdU 标记的 HCMNCs,数量为 3×10^6/0.5 ml 注射 5 min;对照组和模型组术后 24 h 输注等量生理盐水。

1.9　病理学和免疫组化分析

①取材:移植后 4 周用 4% 的多聚甲醛灌注,断头取脑,制成蜡块,连续冠状 6 μm 切片,每隔 5 片取 1 片,用于免疫组化分析[4];剩余进行 HE 染色作病理学分析。②免疫组化染色检测移植细胞:采用 S-P 免疫组化法检测进入脑组织的 HCMNCs,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶后加 2 mol/L 盐酸孵育 30 min,小鼠抗 BrdU 抗体(1∶200)孵育(4 ℃过夜),DAB 显色,中性树胶封片。利用图像分析仪×400 倍光镜下,每张切片随机观察、计数 10 个非重叠视野的 BrdU 阳性细胞,统计脑组织内移植细胞总数[4]。

1.10　统计学处理

数据表达采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有资料均采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和均数间多重比较 q 检验分析差异显著性。

2　结果

2.1　HCMNCs 分离、纯化和 BrdU 标记结果

脐血中分离、纯化的原代 HCMNCs,胞体较小,呈大小均一的圆形,直径约 17 μm,颜色较深,在高倍镜下可见其不停振

动，可在原地旋转，两两细胞间接触后再分离（图1）。BrdU体外标记培养后免疫组化结果表明，HCMNCs呈BrdU免疫阳性细胞，BrdU阳性反应物位于细胞核，呈棕黄或黄褐色，颗粒状或弥漫性分布，其标记率>85%，完全能够满足移植细胞的标记需要（图2）。

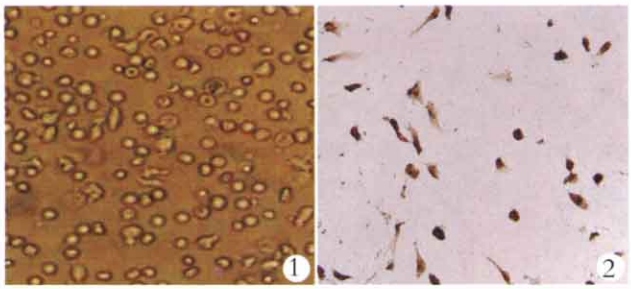


图1 原代HCMNCs （LM×200）

图2 HCMNCs BrdU体外标记培养后免疫组化 （S-P×400）

2.2 各组大鼠主动回避反应率的比较，见表1

表1 各组大鼠术前、注射后2、4周时相点AAR结果[$n=6$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	术前	注射HCMNCs后	
		2周	4周
对照组	91.7±4.1	90.8±3.8	91.7±4.1
模型组	92.5±5.2	52.5±4.2[a]	44.2±4.9[a]
4VO6 h	90.8±3.8	61.7±4.1[ab]	62.5±4.2[ab]
4VO24 h	92.5±4.2	70.0±4.5[abd]	71.7±4.1[abd]
4VO3 d	90.8±4.9	70.8±4.9[abe]	72.5±5.2[abe]
4VO7 d	91.7±4.1	62.5±4.2[abf]	63.3±4.1[abf]
4VO2周	93.3±4.1	60.0±3.2[ac]	61.7±5.2[ab]

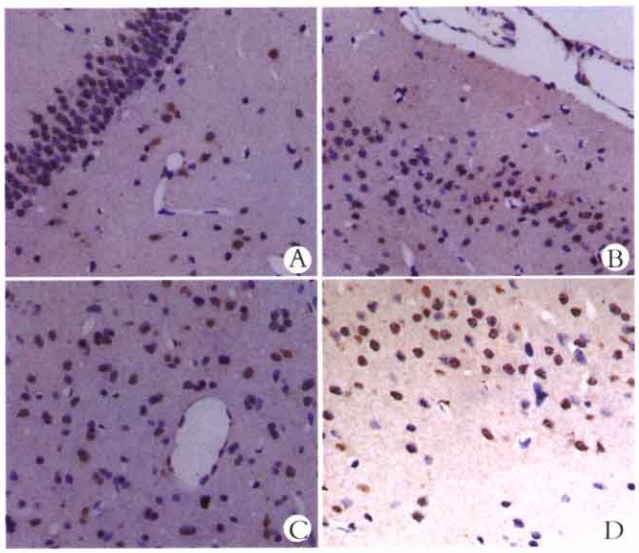
a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，c：$P<0.05$，与模型组比较；d：$P<0.05$，e：$P<0.01$，与4VO6h比较；f：$P<0.05$，与4VO3d比较

2.3 脑组织病理变化

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，细胞核圆而大，核仁清楚。模型组脑组织呈弥漫性损伤，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，程度也明显减轻。

2.4 脑实质的HCMNCs免疫组化检测

移植后第4周，脑组织石蜡切片免疫组化检测，DAB显色进入脑实质的HCMNCs，其细胞核呈棕黄或黄褐色。光镜×400倍下计数10个非重叠视野的HCMNCs，术后6 h组大鼠脑组织内可见数量较多的HCMNCs（3 598±311），24 h和3 d组最多[（4 311±310），（4 426±399）]，7 d组（3 726±356）较前明显减少（$P<0.05$），2周组（2 525±298）更进一步减少（$P<0.01$）。HCMNCs主要分布于海马和大脑皮质区，特别是血管周围，并有局灶聚集现象，基底核、丘脑及室管膜区可见少量HCMNCs（图3）；对照组、模型组未见HCMNCs。



A：海马区HCMNCs；B：大脑皮质区HCMNCs；C：血管周围HCMNCs；D：示HCMNCs在脑组织内存在的局灶聚集现象

图3 4VO-24 h组胞内HCMNCs免疫组化 （S-P×400）

3 讨论

VD的常见病因，以缺血性脑血管病居首位。本实验采用改良的Pulsinellis四血管阻断法（4VO）反复夹闭双侧颈总动脉造成动物脑组织的反复缺血再灌流，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的发病特点，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。

在干细胞替代治疗VD的研究中，以往采取脑组织原位移植和脑室内注射法，取得了一定的效果[6]。近年人们研究发现上述方法存在极大的危险性和局限性，诸如易引起脑水肿、阻塞脑脊液循环系统，以及操作技术要求高、不便多灶移植等；有些学者把注意力转移到外周血管输注法之上[7]，但移植细胞能否通过BBB定向迁移至病变部位是该法成败的关键。

为了对移植入宿主后的HCMNCs迁移、定居和存活情况追踪，移植前用BrdU标记HCMNCs。发现BrdU阳性反应物位于细胞核，呈棕黄或黄褐色，颗粒状或弥漫性分布，其标记率>85%，能够满足移植细胞的标记需要。本实验用BrdU标记培养的HCMNCs，通过颈内动脉注射方式将其移植于VD大鼠的脑组织，移植后4周免疫组化观察到HCMNCs广泛分布于脑组织，表明HCMNCs可以透过VD大鼠BBB。进入脑组

织的 HCMNCs 分布有以下几个特点：①HCMNCs 主要分布在海马和大脑皮质区域；②血管丰富的区域移植细胞多；③在海马和大脑皮质区有灶性聚集趋势。支持 HCMNCs 经血管透过 BBB 进入脑实质的推测。本实验中 VD 大鼠海马和大脑皮质损害最重，HCMNCs 分布范围与其一致，提示病变脑组织是促发 HCMNCs 透过 BBB 定向迁移的重要因素。关于其机制有文献报道可能是：①黏附分子介导的特异性转移[4,8,9]。受损脑组织炎症反应诱导大脑内皮细胞表面粘附分子如 ICAM-1、VCAM、E-selectin 表达增多，与 HCMNCs 表达的抗原性粘附分子（integrin subunits α4、α5，integrin αvβ3、αvβ5、α4vβ1 和 ICAM）之间特异性作用，启动其穿过 BBB 向脑内迁移。②BBB 固有薄弱环节的参与。脉络丛、下丘脑正中隆起、垂体、脑室周围等是 BBB 的薄弱环节，由有孔毛细血管组成，其通透性较大，HCMNCs 可经此途径迁移入脑。③BBB 通透性的改变[10]。脑缺氧缺血不仅破坏 BBB 固有结构，如内皮细胞间紧密连接开放、基膜崩解、星型胶质细胞坏死和凋亡等，还释放大量炎性介质和血管通透性因子导致 BBB 通透性显著增加，有利于 HCMNCs 进入脑实质。④病变脑组织趋化作用。坏死脑组织及其周围神经细胞释放一些趋化因子如 IL-8、单核细胞趋化蛋白-1 和巨噬细胞炎症蛋白 1α，与 HCMNCs 表达的趋化因子受体（CXCR4）和多种细胞因子受体如 IL-1 受体（IL-1R）、IL-3R、IL-4R、IL-6R、IL-7R、IL-8R 及肿瘤坏死因子-α 受体等相互作用，促进 HCMNCs 向病灶迁移[8]。

本实验采用电脑控制的穿梭箱系统对各组大鼠在不同时相点进行了行为学测试，发现注射后 2、4 周时相点，模型组大鼠 AAR 比率均显著低于对照组（$P<0.01$）；术后 6 h 组虽显著低于对照组（$P<0.01$），但均高于模型组，且差异显著（$P<0.01$）；24 h 和 3 d 组较 6 h 组明显增高（$P<0.05$），但二者相比无显著差异（$P>0.05$）；7 d 组开始下降，显著低于 3 d 组（$P<0.05$）；2 周组呈进行性下降，但仍比模型组显著增高（$P<0.05$，$P<0.01$）。移植后 4 周免疫组化检测不仅观察到移植细胞主要集中在海马和大脑皮质区，而且又发现 6 h 治疗组大鼠脑内可见数量较多的 HCMNCs，24 h 和 3 d 组最多，7 d 组较前明显减少，2 周组更进一步减少。一方面，提示慢性脑灌注不足可引起大鼠行为认知功能的损害，而 HCMNCs 可迁移到海马等脑缺血易损伤区域定居、存活，改善 VD 大鼠的学习记忆能力；说明移植细胞可能在海马组织中与周围环境中的神经细胞建立生物功能的突触联系，和/或促进脑组织神经递质含量的增加，对神经突触传递和认知功能起到了保护作用。另一方面，提示透过 BBB 进入脑实质的移植细胞越多，VD 大鼠 AAR 比率提高幅度越大，且 HCMNCs 透过率与移植时间早晚有密切相关性；说明移植细胞对脑功能的修复作用与移植时间的选择至关重要，早期移植优于晚期，1～7 d 内为最佳时间窗。这可能与缺氧缺血后 BBB 通透性增加的时间依赖性、急性炎症反应诱导大脑内皮细胞表面黏附分子显著上调，以及受损脑组织和损伤激活细胞分泌释放的一系列生物活性因子明显增多有关[4,8-10]。

总之，本实验证实了 HCMNCs 可透过 VD 大鼠 BBB，向脑缺血易损伤部位迁移聚集、存活，并显著改善大鼠学习记忆功能，但其透过 BBB 具有特定的适宜时间窗。这为治疗 VD 提供了一种可行的细胞移植治疗方式。此外，有关可控性调节外源性 HCMNCs 更多地透过 BBB 进入脑实质，在脑内定向分化神经细胞，以及如何与周围的神经元建立有生物功能的突触联系等问题尚需进一步深入研究。

参考文献：

[1] JANG Y K, PARK J J, LEE M C, *et al*. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells[J]. J Neurosci Res, 2004, 75(4): 573-584.

[2] HA Y, LEE J E, KIM K N, *et al*. Intermediate filament nestin expressions in human cord blood monocytes (HCMNCs)[J]. Acta Neurochir (Wien), 2003, 145(6): 483-487.

[3] ZIGOVA T, SONG S, WILLING A E, *et al*. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain[J]. Cell Transplant, 2002, 11(3): 265-274.

[4] CHEN J, SANBERG P R, LI Y, *et al*. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke, 2001, 32(11): 2682-2688.

[5] SCHMIDT-KASTNER R, PASCHEN W, OPHOFF B G, *et al*. A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats[J]. Stroke, 1989, 20(7): 938-946.

[6] 张　宏，王　玮，郑志竑，等. 血管性痴呆大鼠海马神经干细胞移植[J]. 福建医科大学学报，2003，37(2)：128-132.

[7] GAO C, WANG J Z, FAN W H, et al. Effects of intravenous administration of marrow stromal stem cells on cognitive impairment of vascular dementia rat models[J]. Chin J Geriatr, 2004, 23(11): 808-812.

[8] KIM J S. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases[J]. J Neurol Sci, 1996, 137(2): 69-78.

[9] BLANN A, KUMAR P, KRUPINSKI J, *et al*. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell, adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 1999, 10(5): 277-284.

[10] SCHOCH H J, FISCHER S, MARTI H H. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain[J]. Brain, 2002, 125(Pt 11): 2549-2557.

（编辑　陈聪连）